

KARDIOMYOZYTÄRE EFFEKTE VON VEGF

JOHANN KLEIN

INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Kardiomyozytäre Effekte von VEGF

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Johann Klein

aus Balchasch

Gießen 2011

Aus dem Physiologischen Institut
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Schulz
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Gutachter: Prof. Dr. H. Möllmann

Tag der Disputation: 18.06.2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen und Akronyme	IV
1. Einleitung	1
1.1 Herzinsuffizienz: Grundlagen und Pathophysiologie	1
1.2 Zytokine und Stammzellen in der kardiovaskulären Forschung	3
1.3 VEGF	5
1.4 Das Ziel dieser Arbeit	9
2. Material	11
2.1 Chemikalien	11
2.2 Antikörper	13
2.3 Primer	13
2.4 Geräte	14
2.4.1 Allgemein verwendete Geräte	14
2.4.2 Zellkultur	14
2.4.3 Messung von Myokardzellkontraktionen im elektrischen Feld	15
2.4.4 Gelelektrophorese, Western Blot und Slot Blot	15
2.4.5 PCR	15
2.4.6 Rattenzytokinarray	16
2.4.7 Erfassung von Hypertrophie in Kardiomyozyten	16
2.4.8 Verbrauchsmaterialien	16
2.4.9 Software	16
3. Methoden	18
3.1 Isolierung von Kardiomyozyten	18
3.1.1 Versuchstiere	18
3.1.2 Präparation von Kardiomyozyten	18
3.2 Zellkultur	20
3.2.1 Vor- und Ausplattieren	20
3.2.2 Zellinduktion	21
3.3 Messung von Myokardzellkontraktionen im elektrischen Feld	21
3.3.1 Elektrische Stimulation	21
3.3.2 Messung der Kontraktionsparameter	22

3.3.3	Messprotokoll.....	24
3.4	Methoden zum Nachweis der Expression auf Proteinebene	24
3.4.1	Vorbereitung der Proben für den Western Blot.....	24
3.4.2	SDS-PAGE.....	25
3.4.3	Western Blot.....	27
3.4.4	Immunologischer Proteinnachweis	28
3.4.5	Slot Blot	29
3.5	Real-Time -PCR	31
3.5.1	RNA-Extraktion	31
3.5.2	Bestimmung der RNA-Konzentration	32
3.5.3	Umwandlung der RNA in cDNA	33
3.5.4	Gelelektrophorese der cDNA-Fragmente.....	34
3.6	Rattenzytokinarray	35
3.7	Erfassung von Hypertrophie in Kardiomyozyten.....	36
3.8	Erfassung von Apoptose und Nekrose in Kardiomyozyten	36
3.9	Statistik	37
4.	Ergebnisse.....	38
4.1	Anteil intakter Kardiomyozyten in einer Präparation	38
4.2	Expression von VEGF und seiner Rezeptoren in Kardiomyozyten	39
4.3	Zytokinsekretion kardialer Progenitorzellen	40
4.4	VEGF-vermittelte Aktivierung von MAP-Kinasen	44
4.5	Einfluss von VEGF auf das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten	45
4.5.1	Akuteffekte	45
4.5.2	Langzeiteffekte	47
4.5.3	Rezeptorabhängigkeit der Langzeiteffekte von VEGF	48
4.5.4	Abhängigkeit der VEGF-Langzeiteffekte von der JNK.....	51
4.5.5	Der Anteil von VEGF an parakrinen Wirkungen kardialer Progenitorzellen	51
4.6	Einfluss von VEGF auf das Hypertrophieverhalten von Kardiomyozyten	53
5.	Diskussion.....	55
5.1	Expression von VEGF-Rezeptoren durch Kardiomyozyten.....	55
5.2	Einfluss auf das Kontraktionsverhalten	56
5.3	Durch kardiale Progenitorzellen sezernierte Zytokine	58
5.4	Intrazelluläre Signaltransduktion	59
5.5	Einfluss auf das Hypertrophieverhalten	59

Inhaltsverzeichnis

5.6	Schlussfolgerung.....	60
6.	Zusammenfassung.....	61
7.	Summary.....	62
8.	Literaturverzeichnis	63
9.	Eidesstattliche Erklärung	73
10.	Danksagung	74

Abkürzungen und Akronyme

AA/BA	Acrylamid/Bisacrylamid
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AT ₁	Angiotensinrezeptor 1
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CRP	C-reaktives Protein
CSA	<i>cross sectional area</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiotreitol
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EF	Ejektionsfraktion
FCS	<i>fetal calf serum</i>
Flk-1	<i>foetal liver kinase 1</i>
Flt-1	<i>fms-related tyrosine kinase 1</i>
HCl	Hydrogenchlorid
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
IL-6	Interleukin 6

isl-1	<i>islet-1</i>
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
KDR	<i>kinase insert domain receptor</i>
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L Diast	diastolische Länge
LIX	Lipopolysaccharid-induziertes CXC-Chemokin
MAP	Mitogen-aktiviertes protein
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
Mg ₂ SO ₄	Magnesiumsulfat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
M-MLV	<i>moloney murine leukaemia virus</i>
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NP	Neuropilin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PIGF	<i>placental growth factor</i>
PVDF	Polyvinylidenfluoridmembran
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT-PCR	<i>real time polymerase chain reaction</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SERCA	<i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>tris buffered saline</i>

TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIMP1	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases 1</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TTP	<i>time to peak</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
VPF	<i>vascular permeability factor</i>

1. Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz: Grundlagen und Pathophysiologie

Als gemeinsame Endstrecke zahlreicher kardiovaskulärer Erkrankungen ist die Herzinsuffizienz in ihrer Ätiologie vielfältig. Nach aktueller Definition ist sie ein Syndrom, das einerseits mit subjektiv vom Patienten empfundenen Symptomen wie Atemnot in Ruhe oder bei Belastung, Erschöpfung, Müdigkeit oder Knöchelschwellungen, und andererseits mit objektivierbaren Zeichen wie zum Beispiel Tachykardie, Tachypnoe und Pleuraergüssen, sowie einer strukturellen oder funktionellen Abnormalität des Herzens, welche in der klinischen, apparativen oder laborchemischen Untersuchung nachzuweisen ist, einhergeht [1]. Besonders häufige Ursachen einer Herzinsuffizienz sind die koronare Herzerkrankung und die arterielle Hypertonie, darüber hinaus können Kardiomyopathien, endokrine Störungen, Infektionen, verschiedene Toxine, genetische Defekte und andere Einflüsse auslösend wirken; in einigen Fällen bleibt die Ursache unbekannt [1, 2]. Aufgrund der sehr speziellen pathophysiologischen Gegebenheiten sollen die exotischen Ätiologien im Rahmen dieser Arbeit nicht im Detail beschrieben werden.

Unabhängig von der genauen Ursache stellt sich bei einer Herzinsuffizienz eine Situation dar, in der der kardiale Auswurf nicht ausreicht, um die Organe adäquat zu perfundieren. Dabei kann zwischen einer systolischen Herzinsuffizienz, bei der die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) herabgesetzt ist, und einer diastolischen Herzinsuffizienz mit erhaltener EF unterschieden werden [3-5]. Konsens über einen exakten Wert, bei dem die Grenze gezogen werden kann, besteht nicht; üblicherweise wird eine EF von 40 bis 50% genannt [1]. Durch den reduzierten Auswurf bei der systolischen Herzinsuffizienz treten kompensatorische Mechanismen in Kraft, welche die Auswirkungen der verminderten Perfusion zumindest anfangs auszugleichen vermögen. Dabei kommt es zunächst zu einer verstärkten Aktivierung des sympathischen Nervensystems über zentrale neuronale Wege sowie über eine

humorale Achse mit verstärkter Katecholaminfreisetzung aus dem Nebennierenmark [6]. Dadurch treten die sympathischen Effekte am Herzen - positive Chrono-, Ino-, Dromo- und Lusitropie – sowie eine Konstriktion peripherer Gefäße in Kraft. So werden das Herzzeitvolumen und der arterielle Perfusionsdruck konstant gehalten. Langfristig dekompensieren diese Mechanismen jedoch und tragen selbst zum Fortschreiten der Herzinsuffizienz bei. Durch die dauerhafte Überaktivierung des sympathischen Nervensystems und den damit einhergehenden deutlich erhöhten Katecholaminspiegel im Plasma werden myokardiale β_1 -Adrenozeptoren herunterreguliert: die Inotropie sinkt. Die α_1 - und β_2 -Dichte nimmt dabei nicht in gleicher Weise ab, hier wird eine kompensatorische Rolle dieser beiden Rezeptoren im Rahmen der β_1 -Reduktion beziehungsweise der kardiotoxischen Eigenschaften chronisch erhöhter Katecholaminkonzentrationen (siehe unten) diskutiert [7, 8]. Weiterhin führt die Überaktivierung des Sympathikus zu einer Deregulation kardiovaskulärer Reflexe mit einer Verschiebung des Gleichgewichtes. So werden inhibitorische Reflexe, wie die Drosselung sympathischer Neurone bei Stimulation der Barorezeptoren oder der Vorhofrezeptoren, abgeschwächt [9, 10], während die Aktivierung des Sympathikus durch kardiale Chemosensoren bei Herzinsuffizienz zuzunehmen scheint [11, 12]. Der Einfluss dieser Reflexanomalien auf die Progression und Prognose der Herzinsuffizienz ist allerdings nicht ausreichend geklärt [13]. Daneben führt eine chronische Aktivierung der kardialen Adrenozeptoren zu katecholaminvermittelten toxischen Effekten, die unter anderem in einer interstitiellen Fibrose, einer linksventrikulären Dilatation sowie einer erhöhten Apoptoserate resultieren [14, 15]. Es soll jedoch nicht unerwähnt bleiben, dass es sich gemäß neueren Daten bei der Mehrzahl der im Rahmen einer Herzinsuffizienz von Apoptose betroffenen Zellen im Herzen um andere Zellen als Kardiomyozyten handelt [16, 17].

Ein weiterer Mechanismus ist die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) infolge eines renalen Blutdruckabfalls sowie einer β_1 -adrenergen Stimulation. Das sezernierte Renin überführt Angiotensinogen in Angiotensin I,

welches wiederum durch das *angiotensin converting enzyme* (ACE) in seine funktionelle Form Angiotensin II umgewandelt wird. Dieses ist eines der wesentlichen Zytokine zur Aufrechterhaltung der kardiovaskulären Stabilität sowie, indirekt, des Elektrolythaushalts. Am besten erforscht ist der Angiotensinrezeptor 1 (AT₁), der in zahlreichen Organen vorkommt und über den Angiotensin II einen starken konstriktorischen Reiz auf Blutgefäße, sowie eine positiv inotrope und chronotrope Wirkung auf Kardiomyozyten ausübt, aber auch die Differenzierung verschiedener Zellen fördert und die Inkretion diverser Wachstumsfaktoren sowie von Aldosteron vermittelt [18, 19]. Langfristig führt aber auch die verstärkte RAAS-Aktivierung zu einem Fortschreiten der Herzinsuffizienz durch Förderung kardialer Fibrose, Apoptose und Funktionseinschränkung durch Angiotensin II und/oder Aldosteron [20-22].

1.2 Zytokine und Stammzellen in der kardiovaskulären Forschung

Schon vor Jahren wurde erkannt, dass neben den beschriebenen neurohumoralen Komponenten auch die Überexpression inflammatorischer Zytokine in der Pathogenese und Progression der Herzinsuffizienz eine Rolle spielt [23]. So gibt es deutliche Hinweise darauf, dass erhöhte Serumwerte von Interleukin-6 (IL-6), des C-reaktiven Proteins (CRP) oder des Tumornekrosefaktors- α (TNF- α) mit einer erhöhten Inzidenz der Herzinsuffizienz assoziiert sind [24, 25]. Bei Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz wurden auch erhöhte Konzentrationen an Matrixmetalloproteinasen (MMP) und des *tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1* (TIMP-1) nachgewiesen [26]. Auch experimentell gelang der Nachweis kardialer Effekte von Zytokinen, wie etwa der Förderung des linksventrikulären Remodellings durch TNF- α über eine Induktion von MMP-9 und MMP-13 [27, 28], einer durch TNF- α und IL-6 hervorgerufenen Downregulation der SERCA2-Expression mit konsekutiv herabgesetzter Wiederaufnahme von Calcium ins

sarkoplasmatische Retikulum [29], im Gegensatz hierzu aber auch gewisser kardioprotektiver Effekte von IL-6 [30].

In jüngerer Zeit wurde der Einfluss verschiedener Zytokine auf die sekretorische Aktivität mesenchymaler Stammzellen und deren Wirkung auf das Herz untersucht. Dabei zeigte sich ein positiver Effekt auf die Produktion des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) durch den *transforming growth factor- α* (TGF- α) und IL-6 [31, 32], sowie ein protektiver Einfluss mesenchymaler Stammzellen auf das Myokard im Postinfarktmodell [33-36]. Dabei ist die Hypothese, dass es verschiedene Zytokine sind, welche die beobachteten Effekte vermitteln, mittlerweile gut belegt [37-39].

Neben diversen anderen Stammzellen sind inzwischen kardiale Progenitorzellen ins Interesse der Forschung gerückt. Dabei handelt es sich um undifferenzierte multipotente Vorläufer im Herzen verschiedener Spezies, darunter des Menschen, die – anders als adulte Zellen – unter anderem für den Transkriptionsfaktor Islet-1 (*isl-1*) positiv sind und sich auch postnatal zu adulten Kardiomyozyten, aber auch zu Endothel- und glatten Muskelzellen differenzieren können [40-43]. *Isl-1*-Knockout-Mäuse weisen schwere Anomalien in der embryonalen Entwicklung des Herzens auf und besitzen postnatal ein *common atrium* sowie, in Ermangelung des rechten Ventrikels und des Ausflusstraktes, ein univentrikuläres Herz. Die besondere Bedeutung der *isl-1*-positiven Zellen ist daher auch von Interesse für das Verständnis der Entstehung angeborener Herzfehler. Hinsichtlich akuter und chronischer Herzinsuffizienz ist allerdings ihre Anzahl im adulten Herzen zu gering, um verlorenes Arbeitsmyokard durch Differenzierung in nennenswertem Maße zu ersetzen [44]. Die intrakoronare Applikation kardialer Stammzellen bei Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion nach Myokardinfarkt befindet sich derzeit in der klinischen Erprobung [45], nachdem entsprechende Versuche *in vitro* und *in vivo* an Ratten positive Ergebnisse gezeigt haben [46-48].

Während der Mechanismus dieser Wirkung noch unklar ist, gelten parakrine Effekte als zumindest eine relevante Komponente [49]. An isolierten Herzmuskelzellen des

Menschen und der Ratte konnte eine positiv kontraktile Wirkung durch Überstände kardialer Stammzellen hervorgerufen werden, außerdem wurde eine Vielzahl von Zytokinen in diesen Überständen nachgewiesen, darunter VEGF [50].

1.3 VEGF

Der Begriff VEGF (*vascular endothelial growth factor*) beschreibt eine Familie proangiogenetischer Faktoren, zu denen VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, sowie der *placental growth factor* PlGF, das virale Molekül VEGF-E, sowie in Schlangengiften vorkommende Proteine mit der gemeinsamen Bezeichnung VEGF-F, gezählt werden [51]. Im engeren Sinne ist mit VEGF üblicherweise der VEGF-A gemeint. Dabei handelt es sich um ein heparinbindendes homodimeres Glykoprotein mit zwei je 23 kDa großen Untereinheiten. Das Gen für VEGF besteht aus acht Exons und bringt durch alternatives Splicing eine Reihe von Isoformen hervor, die nach der Anzahl ihrer Aminosäuren benannt werden. Beim Menschen sind bis heute Formen mit 111, 121, 138, 145, 148, 162, 165, 183, 189 und 206 Aminosäuren bekannt, wobei Isoformen mit 121, 165 und 189 Aminosäuren existieren, die aufgrund eines distalen Splicings in Exon 8 eine andere C-terminale Sequenz aufweisen und denen *antiangiogenetische* Eigenschaften zugeschrieben werden; diese Formen werden mit einem b markiert. Bei den proangiogenetischen Isoformen findet das Splicing in Exon 8 proximal statt [52, 53]. Manche Autoren zweifeln das antiangiogenetische Potential von VEGF_{121b} und VEGF_{165b} jedoch an und postulieren stattdessen eine schwache proangiogenetische Wirkung [54]. Je nach ihrer Länge weisen die Isoformen zum Teil unterschiedliche Eigenschaften auf, so bindet etwa VEGF₁₂₁ nicht an Heparin und hat daher die Fähigkeit zur freien Diffusion, während die langen VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ eine hohe Affinität zu Heparin besitzen und deshalb stark an der extrazellulären Matrix haften. Diese Differenzen werden durch unterschiedliches Splicing in den Exons 6 und 7 vermittelt. VEGF₁₆₅ vereint diese Eigenschaften und kann sowohl sezerniert werden

als auch an der Zelloberfläche und der extrazellulären Matrix haften. Es stellt die vorherrschende VEGF-Isoform dar [55, 56]. Die entsprechenden VEGF-Moleküle von Nagetieren sind um jeweils eine Aminosäure kürzer als beim Menschen [57].

Die VEGF-Rezeptoren sind Tyrosinkinasen mit sieben extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen, einer transmembranösen und einer intrazellulären Domäne. Es sind drei Typen bekannt: VEGFR-1 = *fms-related tyrosine kinase 1* (Flt-1); VEGFR-2 = *kinase insert domain receptor* (KDR) beim Menschen, beziehungsweise *foetal liver kinase 1* (Flk-1) bei Nagern und VEGFR-3 = *fms-related tyrosine kinase 4* (Flt-4). Daneben existieren als Korezeptoren die Neuropiline NP1 und NP2; NP1 wird die Eigenschaft zugeschrieben, einen Komplex mit dem VEGFR-2 bilden und so die Affinität von VEGF zu demselben steigern zu können. VEGFR-1 wird auf der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen, hämatopoetischen Stammzellen und vaskulären Endothelzellen exprimiert und bindet VEGF-A und VEGF-B. VEGFR-2 findet sich auf vaskulären und lymphatischen Endothelzellen und bindet VEGF-A, VEGF-D und VEGF-E. Ihm wird die Hauptrolle für die Vermittlung angiogenetischer, permeabilitätssteigernder und mitogenetischer Effekte zugeschrieben. Die komplexe intrazelluläre Signaltransduktion ist Abbildung 1.1 zu entnehmen. VEGFR-3 schließlich wird ausschließlich auf lymphatischen Endothelzellen exprimiert und bindet VEGF-C und VEGF-D [55-57].

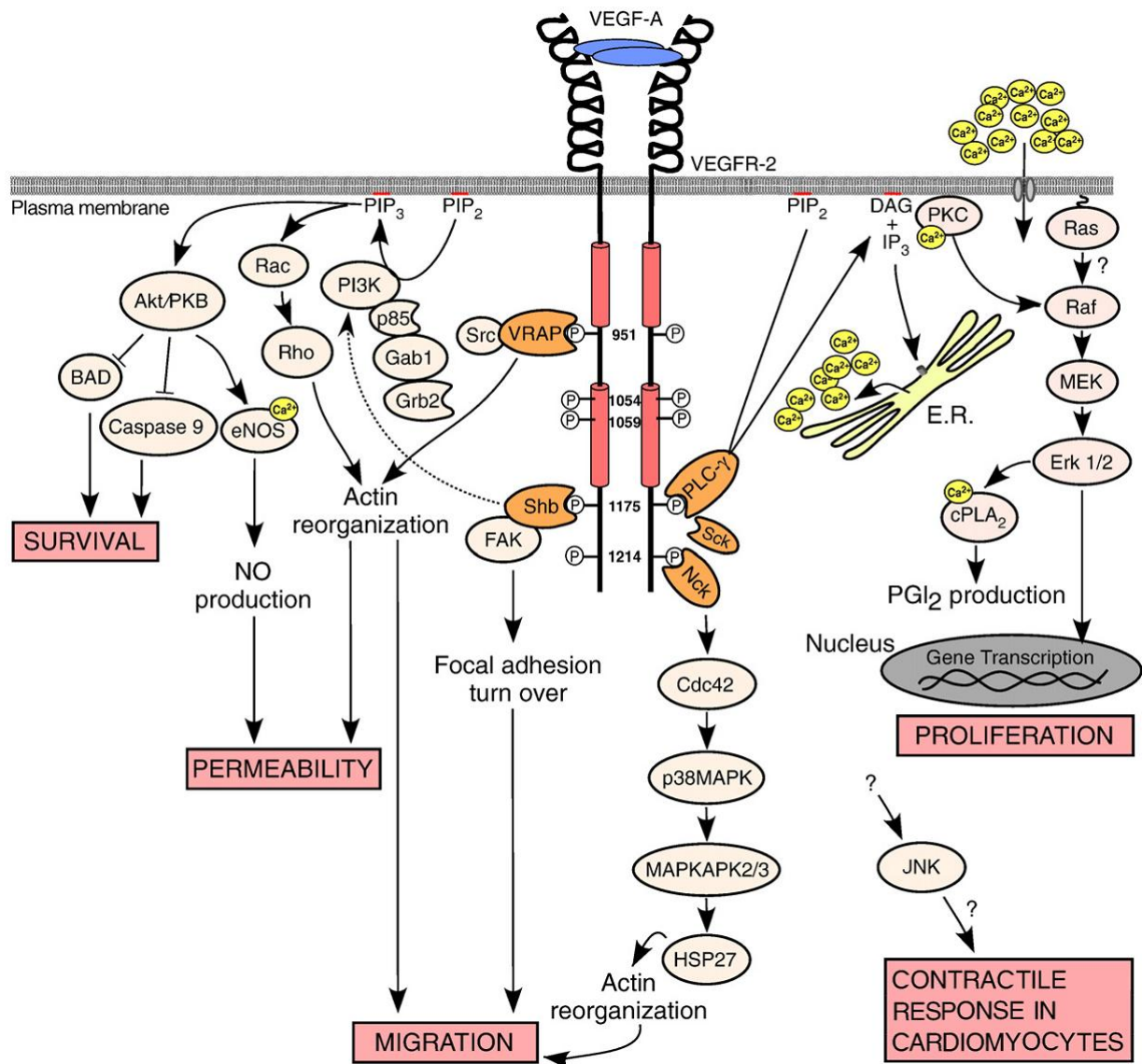


Abbildung 1.1: Intrazelluläre Signaltransduktion des VEGFR-2 nach Bindung des Liganden und Dimerisierung sowie Autophosphorylierung. Abkürzungen: BAD = *Bcl-2 associated death promoter*, cPLA₂ = *cytosolic phospholipase A₂*, DAG = *Diacylglycerol*, eNOS = *endothelial nitric oxide synthase*, Erk 1/2 = *extracellular regulated kinases 1/2*, FAK = *focal adhesion kinase*, Gab1 = *Grb2-associated binder-1*, HSP27 = *heat-shock protein 27*, IP3 = *Inositoltrisphosphat*, JNK = *c-Jun N-terminale Kinasen*, MAPKAP 2/3 = *MAPK-activating protein kinases 2/3*, MEK = *MAPK/Erk kinase*, NO = *nitric oxide*, p38 MAPK = *p38 mitogen-activated protein kinase*, PI3K = *Phosphoinositol-3-Kinase*, PGI₂ = *Prostaglandin I₂*, PIP₂ = *Phosphatidylinositolbisphosphat*, PIP₃ = *Phosphatidylinositoltrisphosphat*, PKB = *Proteinkinase B*, PKC = *Proteinkinase C*, PLC-γ = *Phospholipase C- γ*, Sck = *Shc-like protein*, VEGF = *vascular endothelial growth factor*, VEGFR-2 = *VEGF-Rezeptor 2*, VRAP = *VEGFR-assoziiertes Protein*, TSAd = *T-Zell-spezifisches Adaptermolekül*. Verändert nach [57].

Schwankungen des Sauerstoffpartialdrucks beeinflussen die VEGF-Expression, die über die Hypoxie-induzierbaren Faktoren HIF-1 und HIF-2 gesteuert wird, so dass ein vermindertes O₂-Angebot zu einer vermehrten Freisetzung von VEGF-mRNA führt. Daneben wird die Expression durch zahlreiche Wachstumsfaktoren und Hormone gefördert [56].

Die Effekte von VEGF sind äußerst vielfältig und beinhalten neben der namensgebenden Förderung des Wachstums vaskulärer Endothelzellen als Grundlage der embryonalen Genese von Blut- und Lymphgefäßen auch die Angiogenese beim Erwachsenen, so etwa bei der Wundheilung, der Reifung des Corpus luteum oder dem Aufbau von Muskulatur [56]. Darüber hinaus erhöht es die vaskuläre Permeabilität: vor der Erstbeschreibung von VEGF 1989 [58] wurde 1983 ein Protein *vascular permeability factor* (VPF) genannt [59], bevor beide als das gleiche Molekül identifiziert wurden [60, 61]. VEGF wirkt außerdem antiapoptotisch, steigert die Produktion von Surfactant, bewirkt eine Vasodilatation und Hypotension und beeinflusst die Hämatopoese [56]. Seit einigen Jahren wird ein Zusammenhang zwischen VEGF-Genvariationen und der Inzidenz von amyotropher Lateralsklerose (ALS) postuliert, wobei anfängliche Beobachtungen inzwischen teilweise relativiert wurden [62].

Aufgrund der starken Angiogenese in bösartigen Tumoren hat VEGF seit seiner Entdeckung herausragende Bedeutung in der onkologischen Forschung erlangt [63]; Therapien mit monoklonalen VEGF-Antikörpern, allen voran Bevacizumab, haben inzwischen bei einer Vielzahl von Krebsarten Einzug in die Klinik gehalten [64]. Eine kürzlich erschienene Metaanalyse ergab jedoch bei onkologischen Patienten eine gesteigerte Rate an tödlichen Nebenwirkungen unter Bevacizumab, was die Zukunft der Substanz im Augenblick ungewiss erscheinen lässt [65].

In der Ophthalmologie sind Behandlungen, die auf eine Neutralisierung von VEGF abzielen, bei Erkrankungen mit einer neovaskulären Komponente ebenfalls von Relevanz [66, 67].

Die Rolle von VEGF im gesunden und kranken Herzen wird mit zunehmender Intensität untersucht. Ein Interessensgebiet stellt dabei seine Wirkung in verschiedenen Postinfarktmodellen dar. Hier zeigten sich günstige Effekte in Hinblick auf Parameter wie myokardiale Kontraktilität, Remodelling, Apoptose oder Infarktgröße bei unterschiedlichen Spezies [68-72]. Auch in anderen Zusammenhängen wurden eine antiapoptotische Wirkung sowie eine Funktionsverbesserung nachgewiesen [73, 74]. Gemeinsam mit Endothelin scheint VEGF zu einer Hypertrophie von Kardiomyozyten beizutragen [75]; allein oder im Kontext einer Kupferexposition allerdings wirkt es antihypertroph [76, 77]. Des Weiteren wurde VEGF als entscheidender Faktor für die spontane Differenzierung von Stammzellen zu Kardiomyozyten identifiziert [78, 79] sowie als wichtiges Element in der Vermittlung kardioprotektiver Effekte durch Stammzellen beschrieben [80-82].

1.4 Das Ziel dieser Arbeit

Als bedeutender Faktor der Angio- und Vaskulogenese ist VEGF im Organismus nahezu allgegenwärtig und allein deswegen schon von großem Interesse. Inzwischen besteht kein Zweifel mehr daran, dass seine Funktion jedoch weit über die Neubildung von Blut- und Lymphgefäßen hinausgeht. So spielt VEGF für die Forschung und zum Teil für die Klinik in den verschiedensten medizinischen Gebieten von der Augenheilkunde über die Onkologie bis hin zur Unfallchirurgie eine Rolle. Darunter fällt auch die Kardiologie, für die VEGF aufgrund seiner kardioprotektiven Eigenschaften und seines Einflusses auf Stammzellen relevant ist. Das Wissen um seine Wirkungen hat innerhalb der letzten Jahre deutlich zugenommen und neue therapeutische Konsequenzen erscheinen für die nahe Zukunft realistisch. Jedoch ist die Erforschung der durch VEGF vermittelten Effekte auf die kardiale Funktion stark auf Experimente *in vivo* sowie *in situ* konzentriert, was die Unterscheidung zwischen den Folgen einer verbesserten Vaskularisierung des Myokards einerseits und einem

direkten parakrinen Einfluss auf die Kardiomyozyten andererseits nicht erlaubt. Deswegen wurden für diese Arbeit isolierte Herzmuskelzellen der adulten Ratte verwendet und mit VEGF allein, in Kombination mit Blockern seiner Rezeptoren oder mit Überständen kardialer Progenitorzellen stimuliert, woraufhin Parameter ihrer Kontraktion bestimmt wurden. Die Überstände wurden auf die in ihnen enthaltenen Zytokine überprüft. Weiterhin erfolgte eine Untersuchung des Einflusses von VEGF auf das Volumen von Kardiomyozyten. Zum Nachweis der kardiomyozytären Expression der VEGF-Rezeptoren auf mRNA- und Proteinebene sowie von VEGF selbst auf mRNA-Ebene wurden PCR und Western Blot durchgeführt. Mit einem Slot Blot wurde die Aktivierung von MAP-Kinasen durch VEGF beurteilt. Die Fragen, die diese Arbeit zu beantworten versucht, lauten:

- Welchen Einfluss übt VEGF auf das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten aus?
- Welche Rolle spielt es bei der parakrin vermittelten Kontraktionssteigerung durch kardiale Progenitorzellen?
- Welche Wirkung hat es auf das Hypertrophieverhalten von Kardiomyozyten?
- Über welchen Rezeptor und welche intrazellulären Wege werden die kardiomyozytären Wirkungen von VEGF vermittelt?

2. Material

2.1 Chemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Qbiogene, Heidelberg
6-Aminohexansäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
Benzonase	Merck, Darmstadt
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat	Calbiochem, Schwalbach
Bisacrylamid	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin	Sigma, Taufkirchen
100 bp DNA ladder	New England BioLabs, Frankfurt am Main
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Carbogen	Linde, Pullach
Carnitin	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Collagenase, Typ CLS II	Biochrom, Berlin
Cytosin- β -Arabinofuranosid	Sigma, Taufkirchen
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid	Applichem, Darmstadt
Dithiothreitol	Sigma, Taufkirchen
dNTP	Invitrogen, Karlsruhe
Dithiotreitol	Sigma, Taufkirchen
EDTA-Natriumsalz	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum	PAA, Cölbe
Gentamicin	Invitrogen, Karlsruhe

2. Material

Glukose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hoechst 33258	Sigma, Taufkirchen
Isopropranol	Roth, Karlsruhe
iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad, München
JNK Inhibitor II	Calbiochem, Schwalbach
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Medium 199/Earl's salts	Biochrom, Berlin
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Molekulargewichtsmarker	GE Healthcare, Freiburg
Natriumbicarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	Merck, Darmstadt
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid	Roche, Mannheim
Oligo-dt	Roche, Mannheim
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
peqGOLD TriFast	PEQLAB, Erlangen
Propidiumjodid	Sigma, Taufkirchen
RNasin	Promega, Mannheim
5xRT-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
SuperSignal West Pico	
Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific, Nidderau
Tetramethylethyldiamin	Serva, Heidelberg

2. Material

Tris/HCl	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Vanadat	Merck, Darmstadt
VEGF ₁₆₄	Calbiochem, Schwalbach
VEGF-C	Calbiochem, Schwalbach
VEGF Inhibitor, Flt ₂₋₁₁	Calbiochem, Schwalbach
VEGF Inhibitor, V1	Calbiochem, Schwalbach

2.2 Antikörper

Alle Antikörper wurden von Sigma, Taufkirchen, bezogen.

Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1

Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2

Anti-rabbit p38/38p MAP-Kinase

Anti-rabbit p44/42 MAP-Kinase

Anti-mouse pJNK MAP-Kinase

2.3 Primer

Alle Primer wurden von Invitrogen, Karlsruhe, bezogen.

VEGF	forward	5'-TGC CCC TAA TGC GGT GTG CG-3'
	reverse	5'-GGC TCA CAG TGA ACG CTC CAG G-3'
	NM_031836.2	
VEGFR-1	forward	5'-CGG GTG TCT GCT TCT CAC AG-3'
	reverse	5'-CTT TTG TCC TCC TGG CTC AC-3'

2. Material

VEGFR-2 forward 5'-AGC CGC CTC TGT GGG TTT GC-3'
 reverse 5'-AGT CAC GCG GAG TGT TGG GC-3'
NM_013062.1

2.4 Geräte

2.4.1 Allgemein verwendete Geräte

Anlage für deionisiertes Wasser	Millipore, Eschborn
Glasgeräte	Schott, Mainz
Magnetheizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Schüttler	Biometra, Göttingen
Vortexer	Heidolph, Kelheim
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zentrifuge	Thermo Fischer, Langenselbold

2.4.2 Zellkultur

Präparationsbesteck	Aeskulap, Tuttlingen
Langendorff-Apparatur	Eigenbau der Physiologie Gießen
Gewebehacker	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Mikroskop	Nikon, Tokio, Japan
Kulturschalen	Becton Dickinson, Heidelberg

2.4.3 Messung von Myokardzellkontraktionen im elektrischen Feld

Interface	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Mikroskop	Olympus, Tokio, Japan
Monitor	Philips, Köln
Oszillograph	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Stimulator	Eigenbau der Physiologie Gießen

2.4.4 Gelelektrophorese, Western Blot und Slot Blot

Hoefer-Elektrophoresekammer	GE Healthcare, Freiburg
Hoefer-Glasplatten GE	Healthcare, Freiburg
Hoefer-Plattenklemmen	GE Healthcare, Freiburg
Hoefer-Profilformer	GE Healthcare, Freiburg
Hoefer-Spacer	GE Healthcare, Freiburg
Immobilon P (PVDF-Membran)	Millipore, Eschborn
Netzgerät	Biometrische Analytik, Göttingen
Elektroblotkammer	Biometra, Göttingen
Filterpapier	Biotec Fischer, Reiskirchen
Hamiltonspritze (50µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Minifoldkammer	Schleicher & Schuell, Dassel

2.4.5 PCR

Thermocycler	Techne, Wertheim-Bestenheid
iCycler	BioRad, München

2. Material

Nano Drop ND-1000	PEQLAB, Erlangen
Elektrophoresekammer	GE Healthcare, Freiburg

2.4.6 Rattenzytokinarray

RayBio Rat Cytokine Antibody Array 1	RayBiotech/Hoelzel Diagnostics, Köln
--------------------------------------	--------------------------------------

2.4.7 Erfassung von Hypertrophie in Kardiomyozyten

Fluoreszenzmikroskop	Keyence, Neu-Isenburg
----------------------	-----------------------

2.4.8 Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
50-ml-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellschaber	Becton Dickinson, Heidelberg

2.4.9 Software

Image Quant	Molecular Dynamics, Krefeld
Microsoft Excel	Microsoft, Redmont, WA, USA
Microsoft Word	Microsoft, Redmont, WA, USA
Mucell	Scientific Instruments, Heidelberg
iCycler™ iQ Optical System Software	BioRad, München
Nano Drop	PEQLAB, Erlangen

2. Material

SPSS Statistics 17.0

SPSS, München

BZ Observation

Keyence, Neu-Isenburg

BZ Analyzer

Keyence, Neu-Isenburg

Chemi-Capt

Vilber Lourmat, Eberhardzell

3. Methoden

3.1 Isolierung von Kardiomyozyten

3.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden ca. 200 bis 300 g schwere männliche Wistar-Ratten im Alter von etwa 3 Monaten verwendet. Die Tiere stammten aus eigener Züchtung des Physiologischen Institutes und hatten während der Haltung stets Zugang zu Nahrung und Wasser.

3.1.2 Präparation von Kardiomyozyten

Die angewandte Präparation adulter Kardiomyozyten der Ratte wurde erstmals 1982 von Piper et al. beschrieben [83].

Dabei wurde eine auf 37°C aufgewärmte Langendorff-Anlage mit Aqua bidest und anschließend mit Powell-Medium gespült. Anschließend wurde sie mit 80 ml Powell-Medium befüllt, welches mit einem Gemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂ (Handelsname Carbogen) begast wurde. Das Powell-Medium musste durch ausreichend lange Zirkulation die Temperatur von 37°C annehmen, bevor die folgenden Arbeitsschritte ausgeführt werden konnten.

Powell-Medium:

NaCl	110 mmol/l
KCl	2,6 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mmol/l
Mg ₂ SO ₄	1,2 mmol/l
NaHCO ₃	25 mmol/l
Glukose	11 mmol/l

3. Methoden

Auf die Tötung der mit Diethylether betäubten Ratten durch Genickbruch folgten eine Thorakotomie und Entnahme des Herz-Lungen-Paketes. Anschließend wurde das Herz in einer mit kalter physiologischer Kochsalzlösung gefüllten Petrischale präpariert, am Aortenstumpf an der Langendorff-Anlage befestigt und retrograd perfundiert: zunächst zur Spülung 5 min mit Powell-Medium, welches nicht rezirkulierte, daraufhin 25 min rezirkulierend mit einer Kollagenaselösung bei einer Flussrate von 2 bis 3 ml pro Minute.

Kollagenaselösung:

Kollagenase	ca. 20 mg (abhängig von der jeweiligen Charge)
Powell-Medium	10 ml
CaCl ₂ (100 mmol/l)	12,5 µl

Im Anschluss wurden die Vorhöfe und großen Gefäße entfernt und die Ventrikel im Gewebeschneider bei einer Schnittbreite von 700 µm zerkleinert. Der so entstandene Zellbrei wurde zum Nachverdau bindegewebiger Bestandteile 10 min in einem mit Kollagenaselösung gefüllten Teflongefäß unter Begasung mit Carbogen vorsichtig auf- und abpipettiert.

Das Material wurde durch ein Nylonnetz mit 200 µm Porengröße filtriert und anschließend 3 min bei 400 U/min zentrifugiert; der Überstand wurde abgesaugt. Das Sediment wurde in 10 ml Powell-Medium aufgenommen, dem 200 µmol/l CaCl₂ beigemischt waren. Es folgte erneut – diesmal für 2 min – eine Zentrifugierung bei 400 U/min. Das Material wurde nun in Powell-Medium mit 400 µmol/l CaCl₂ aufgenommen und auf mit Powell-Medium sowie 4 % Albumin und 1 mmol/l CaCl₂ gefüllte Reagenzgläser verteilt, die bei 300 U/min 1 min zentrifugiert wurden; der Überstand wurde wieder verworfen. Auf diese Weise konnte eine Zellpopulation isoliert werden, die zu etwa 70-80 % aus intakten ventrikulären Herzmuskelzellen bestand.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Vor- und Ausplattieren

Die Kulturschalen wurden vor der Gewinnung der Zellen über Nacht im Brutschrank bei 37°C mit Vorplattiermedium beschichtet.

Vorplattiermedium:

M199/HEPES gepuffert	x ml
FCS	4 % (vol/vol)
Penicillin	100 IE/ml
Streptomycin	100 µg/ml ad 1 l

M199/HEPES gepuffert:

Medium 199/Earl's salts	9,8 g/l
HEPES	15 mmol/l
pH = 7,4	

Nach der Isolation wurden die Kardiomyozyten in etwa 25 ml 37°C warmen CCT-Mediums pro Herz gegeben und nach Absaugen des Vorplattiermedium aus den Schalen gleichmäßig auf diese verteilt, um daraufhin für ungefähr zwei Stunden im Brutschrank bei 37°C CO₂-frei inkubiert zu werden. In dieser Zeit hafteten sich die intakten Herzmuskelzellen an den Schalenboden an, während das übrige Material anschließend abgesaugt und jede Schale mit 1 ml Waschmedium gefüllt wurde.

CCT-Medium:

M199/HEPES gepuffert	x ml
Creatin	5 mmol/l
Carnitin	2 mmol/l
Taurin	5 mmol/l
Penicillin	100 IE/ml
Streptomycin	100 µg/ml

3. Methoden

Cytosin- β -Arabinofuranosid 10 $\mu\text{mol/l}$

pH = 7,4

Waschmedium:

CCT-Medium x ml

Penicillin 100 IE/ml

Streptomycin 100 $\mu\text{l/ml}$

Gentamicin 0,1 % (vol/vol)

Es folgte eine 24-stündige CO_2 -freie Inkubation im Brutschrank bei 37°C.

3.2.2 Zellinduktion

Für die Stimulation der Zellen wurden diese, je nach Versuch, mit VEGF-A, VEGF-C, Überständen kardialer Progenitorzellen, sowie, zur Hypertrophieinduktion, mit FCS inkubiert. Die dabei verwendeten Konzentrationen werden im Ergebnisteil spezifiziert.

Als pharmakologische Hemmstoffe der VEGF-Rezeptoren 1 (Flt-1) beziehungsweise 2 (Flk-1 = KDR) wurden die Inhibitoren Flt₂₋₁₁ und V1 in Konzentrationen von jeweils 1 $\mu\text{g/ml}$ benutzt; zur Blockierung der JNK 100 nmol/l des JNK-Inhibitors II. Die Inkubation mit den Hemmstoffen ging der Stimulation um circa 30 min voraus.

3.3 Messung von Myokardzellkontraktionen im elektrischen Feld

3.3.1 Elektrische Stimulation

Die Methode zur Messung von Einzelzellkontraktionen im elektrischen Feld wurde 2003 von Langer et al. beschrieben [84].

Die Kulturschale mit den zu untersuchenden Kardiomyozyten wurde auf dem Objektisch des Mikroskopes platziert und mit einem Deckel verschlossen, an dem zwei rechteckige Drahtelektroden aus Silberchlorid befestigt waren, die 5 mm tief in die Flüssigkeit eintauchten; eine fungierte dabei als Kathode, die andere als Anode. Über die Elektroden wurden 0,5 ms lange biphasische Rechteckimpulse von 60 V Spannung appliziert. So konnte im Medium mit den Kardiomyozyten ein näherungsweise homogenes elektrisches Feld erzeugt werden.

3.3.2 Messung der Kontraktionsparameter

Zur Messung der Kontraktionsparameter wurden Geräte der Heidelberger Firma Scientific Instruments GmbH eingesetzt.

Mit dem Mikroskop waren eine Videokamera, über die das Okularbild in 500-facher Vergrößerung auf einem Bildschirm angezeigt wurde, sowie eine Zeilenkamera, die über einen Hell-Dunkel-Kontrast die Zellgrenzen gegenüber dem Hintergrund diskriminieren konnte, verbunden. Wurde die Kamerazeile durch Drehung der Kamera nun parallel zur Längsachse der Zelle ausgerichtet, konnte die Länge der Zelle während der Kontraktion und Relaxation erfasst und so die Verkürzung berechnet werden. Die Zeilenkamera wandelte das Bild in elektrische Signale um, die auf einem Zweikanaloszillographen dargestellt wurden, welcher über ein Interface angeschlossen war. Änderungen der Helligkeit, also die Zellgrenzen, wie sie von der Zeilenkamera erfasst wurden, stellten sich auf der Anzeige des Oszillographen als vertikale Auslenkungen dar.

Am zweiten Kanal des Oszillographen lag über das Interface eine feste Spannung an. Diese konnte über ein Potentiometer des Interface angesteuert werden, was auf dem Oszillographen als horizontale Bewegung einer Markierung sichtbar wurde. Diese Markierung wurde vor die erste vertikale Auslenkung des Zellbildes – also die Darstellung des Hell-Dunkel-Kontrastes zwischen dem Hintergrund und der Zellgrenze

– positioniert. Wenn die Spannung des Zellbildes den durch die Markierung vorgegebenen Wert erreichte, wurde die Interface-Spannung am zweiten Kanal durch den Oszillographen aufgezeichnet. Dabei sprang auf seiner Anzeige eine horizontale Linie, die sich bis zur Markierung der Interface-Spannung erstreckte, aus der Nullposition in die Höhe. Während einer Zellkontraktion verschob sich die Auslenkung des Zellbildes und mit ihr die Position, an der die vorgegebene Interface-Spannung erreicht wurde, sowie die Stelle, an der die horizontale Linie nach oben sprang. In der Darstellung auf der Anzeige äußerte sich dies abwechselnd in einer Verlängerung und Verkürzung der Linie, über die also die Zellkontraktionen auf dem Oszillographen beobachtet werden konnten. Am gegenüberliegenden Zellrand wurde analog verfahren.

Das Vorhandensein oder die Abwesenheit der Interface-Spannung übermittelte der Oszillograph über das Interface an einen angeschlossenen Rechner, auf dem das Programm Mucell von Scientific Instruments aus diesen Informationen die Zelllänge zu verschiedenen Zeitpunkten errechnete und so einen Graphen mit der Länge der Zelle als Funktion der Zeit darstellen konnte.

Aus den Kontraktionen wurden folgende Parameter errechnet:

- L Diast: die maximale Zelllänge (diastolische Zelllänge) in μm
- TTP (time to peak): die Zeit vom Beginn der Kontraktion bis zu ihrem Maximum in ms
- Amplitude: die maximale Zellverkürzung während der Systole in μm
- TTP50%: die Zeit von der 50%igen bis zur maximalen Zellkontraktion in ms
- R50%: die Zeit vom Beginn der Relaxation bis zur 50%igen Relaxation in ms
- Contraction Velocity: die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ (bestimmt aus der ersten Ableitung der Kontraktionskurve)
- Relaxation Velocity: die maximale Relaxationsgeschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ (bestimmt aus der ersten Ableitung der Kontraktionskurve)

Aus diesen Werten wurden wiederum berechnet:

- dL/L (%): die Relation der maximalen Zellverkürzungsstrecke zur enddiastolischen Zelllänge

Im Ergebnisteil erfolgt aus Gründen der Übersichtlichkeit eine Beschränkung auf die physiologisch aussagekräftigsten Parameter dL/L (%), Contraction Velocity und Relaxation Velocity.

3.3.3 Messprotokoll

Es wurden Zellkontraktionen bei 0,5 Hz, 1 Hz und 2 Hz ausgelöst; pro Zelle und Frequenz wurden vier Kontraktionen aufgezeichnet, aus denen hinterher in Microsoft Excel die Mittelwerte, Standardabweichungen und Mediane der oben genannten Parameter berechnet wurden.

Die Kardiomyozyten einer Zellkultur, also eines Herzens, wurden auf 24 Schalen verteilt und pro Schale wurden drei bis vier Zellen gemessen.

3.4 Methoden zum Nachweis der Expression auf Proteinebene

3.4.1 Vorbereitung der Proben für den Western Blot

Die isolierten Kardiomyozyten wurden zunächst 10 min mit Lysispuffer behandelt; das darin enthaltene negativ geladene Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) führte durch Bindung an hydrophobe Bereiche der Proteine zu einer gleichmäßigen negativen Ladung und einer Entfaltung der Tertiärstruktur. Die weiteren Bestandteile des Lysispuffers trugen zur Denaturierung der Peptide und Unterdrückung von Wechselwirkungen mit anderen Molekülen bei, so wurde durch

3. Methoden

Dithiotreitol (DTT) eine Spaltung der Disulfidbrücken herbeigeführt, Natriumvanadat hemmte die Protein-Tyrosin-Phosphatasen, für die Glycerophosphat außerdem ein falsches Substrat darstellte, so dass ihre Aktivität gehemmt wurde. Nach Ablauf der Zeit wurden durch Zugabe von Benzonase zur Verdauung von Nukleinsäuren weitere 10 min abgewartet, bevor das Produkt in Eppendorfgefäße abgefüllt wurde. Schließlich wurden diese mit 20 µl Laemmli-Puffer pro 200 µl der Proben versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt.

Lysispuffer:

Tris/HCl	1,21 g
SDS	4 g
Millipore-Wasser	ad 200 ml

Laemmli-Puffer:

SDS	0,2 g
DTT	0,154 g
Glycerin (100 %)	2 ml
Bromphenolblau	0,2 ml
Tris/HCl	500 mmol/l
aqua bidestillata	1,8 ml

3.4.2 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die räumliche Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse. Dies beruht auf der Tatsache, dass kleinere Moleküle im elektrischen Feld bei gleicher Nettoladung schneller und weiter wandern als größere.

3. Methoden

Für die Durchführung der Gelelektrophorese wurde auf die 1970 von Laemmli beschriebene diskontinuierliche Methode zurückgegriffen [85]. Dabei besteht die Gelstruktur aus zwei Komponenten, dem Trenn- und dem Sammelgel.

Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten, die durch Spacer spaltbreit auseinandergehalten und durch Klammern stabilisiert wurden, gegossen. Es wurde mit etwas Wasser abgedeckt und eine Stunde aushärten gelassen, woraufhin das Wasser abgegossen und das Trenngel mit Sammelgel überschichtet wurde. Es wurde ein Profilformer zur Erzeugung von Taschen für die spätere Aufnahme der Proben eingesetzt; das Gel blieb für weitere 30 min zum Trocknen stehen.

Trenngel (7,5 %):

AA/BA (30:1)	5,25 ml
Trenngelpuffer	4,75 ml
aqua bidestillata	9,55 ml
APS 10 % (wt/vol)	200 µl
TEMED	15 µl
SDS 10 % (wt/vol)	200 µl

Trenngelpuffer:

Tris/HCl	1,5 mol/l
pH 8,6	

Sammelgel:

AA/BA (30:1)	1,2 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml
aqua bidestillata	6,4 ml
APS 10 % (wt/vol)	100 µl
TEMED	12 µl
SDS 10 % (wt/vol)	50 µl

3. Methoden

Konzentrierter Anodenpuffer C:

Tris/HCl	300 mmol/l
Methanol	20 % (vol/vol)
pH = 10,4	

Anodenpuffer B:

Tris/HCl	30 mmol/l
Methanol	20 % (vol/vol)
pH = 10,4	

Kathodenpuffer A:

Tris/HCl	25 mmol/l
6-Aminohexansäure	40 mmol/l
Methanol	20 % (vol/vol)
pH = 9,4	

3.4.4 Immunologischer Proteinnachweis

Die Membran wurde auf dem Schüttler eine Stunde in 1xTBS mit 3 % BSA behandelt, danach mit 1xTBS gewaschen und über Nacht im Kühlraum mit dem Erstantikörper inkubiert, welcher spezifisch an das zu ihm passende Antigen band.

10xTBS-Puffer:

Tris/HCl	10 mmol/l
NaCl	150 mmol/l
pH = 7,4	

Danach wurde die Membran 30 min mit 1xTBS + 0,1 % Tween 20 gewaschen und im Anschluss eine Stunde mit dem Zweitantikörper behandelt, der eine Affinität zu allen Antikörpern derselben Spezies hatte. An diesen Zweitantikörper war das Enzym Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase*, HRP) gekoppelt, das für die weiter

3. Methoden

unten beschriebene visuelle Darstellung der Proteine von Bedeutung war. Es folgte abschließend ein fünfminütiger Waschvorgang mit 1xTBS + 0,1 % Tween 20.

Antikörperlösung:

Tris/HCl	50 mmol/l
NaCl	150 mmol/l
Tween 20	0,05 % (vol/vol)
BSA	5 % (wt/vol)
pH = 7,4	

Nun wurde die Membran mit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate von Thermo Fisher Scientific (Nr. 34080) inkubiert. Das darin enthaltene Luminol diente der HRP als Substrat und wurde von ihr zum instabilen 3-Aminophthalat oxidiert, welches sich im angeregten Zustand befand und beim Übergang in einen energieärmeren Zustand Lichtquanten von 425 nm Wellenlänge emittiert. Diese wurden mit dem Detektionssystem ChemiDoc XRS von BioRad eingefangen und mit der Software Chemi-Capt von Vilber Lourmat analysiert. Durch die Chemilumineszenz des 3-Aminophthalat konnte so indirekt das jeweils gesuchte Protein sichtbar gemacht werden.

3.4.5 Slot Blot

Der Slot Blot ermöglicht einen gegenüber dem Western Blot einfacheren Proteinnachweis ohne die Notwendigkeit einer Elektrophorese. Die gesuchten Proteine werden hierbei durch immunologische Nachweisverfahren auf einer Membran sichtbar gemacht, ohne sie von einem Gel transferieren zu müssen. Durch diese Vereinfachung gibt es jedoch keine Möglichkeit, verschiedene Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse aufzutrennen.

Zur Durchführung des Slot Blot wurden eine Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF-Membran) und ein Filterpapier auf die Form und Größe einer Minifold-Slot-Blot-Kammer zugeschnitten. Das Filterpapier wurde in Anodenpuffer B getränkt und luftblasenfrei auf dem Boden der Kammer platziert, darauf wurde die mit Methanol und Anodenpuffer B benetzte Membran, ebenfalls unter Vermeidung von Luftblasen, gelegt. Der Aufsatz der Kammer wurde angebracht und die Kammer an eine Vakuumpumpe angeschlossen.

Nach dem Erhitzen der Eppendorfgefäße (siehe 3.4.1) wurden 25 µl der darin enthaltenen Proben pro Feld der Kammer aufgetragen und 5 min unter Vakuum einwirken gelassen. Danach wurde die Membran mit Blotpuffer B gespült, um anschließend nacheinander in Methanol und Wasser getaucht und eine Stunde mit 1xTBS + 3 % BSA auf dem Schüttler behandelt zu werden.

Die Membran wurde nun 5 min mit 1xTBS gewaschen und daraufhin über Nacht mit dem Erstantikörper inkubiert. Anschließend folgte zweimaliges Waschen der Membran mit 1xTBS + 0,1 % Triton X-100 für jeweils 5 min, eine einstündige Inkubation mit dem Zweitantikörper und ein erneuter Waschvorgang, nun mit 1xTBS + 0,5 % Triton X-100. An den Zweitantikörper war das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt, was dazu führte, dass der Prozess des immunologischen Proteinnachweises von dem unter 3.4.4 beschriebenen abwich.

Die Membran wurde 1 min in AP-Puffer geschwenkt und danach unter Lichtabschluss mit einer Entwicklerlösung behandelt. Das darin enthaltene 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) wurde von der Alkalischen Phosphatase dephosphoryliert, wodurch 5-Brom-4-chlor-indolyl entstand, welches durch Oxidation an der Luft und Dimerisierung einen blauen Farbstoff bildete. Das ebenfalls in der Lösung vorhandene Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) wurde durch die Alkalische Phosphatase reduziert, wodurch (über einen Zwischenschritt) ebenfalls ein blauer Farbstoff entstand. Zum Abschluss wurde die Membran mit aqua bidestillata gewaschen. So wurde der Zweitantikörper, indirekt also das gesuchte Protein, durch Färbung

3. Methoden

sichtbar gemacht, an deren Intensität eine quantitative Aussage gemacht werden konnte.

AP-Puffer:

Tris/HCl	100 mmol/l
MgCl ₂	5 mmol/l
NaCl	10 mmol/l
pH = 9,5	

Entwicklerlösung:

AP-Puffer	50 ml
BCIP	7 mg
NBT	15 mg

Zur Auswertung wurde das Programm ImageQuant verwendet. Dabei wurden die gefärbten Bereiche markiert und die Software ordnete jedem Feld anhand der Intensität der Schwärzung einen Zahlenwert zu, mit dem eine vergleichende Aussage über die jeweilige Proteinmenge gemacht werden konnte.

3.5 Real-Time -PCR

3.5.1 RNA-Extraktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein 1986 von Mullis et al. beschriebenes Verfahren zur exponentiellen Vermehrung spezifischer DNA-Sequenzen in vitro [86]. Es ermöglicht den Nachweis selbst kleinster Mengen von Nukleinsäuren.

Um die Transkription eines Gens festzustellen, muss die entsprechende mRNA nachgewiesen werden. Da es für RNA jedoch, anders als für DNA, keine Polymerase gibt, die eine PCR ermöglichen würde, muss sie mittels einer Reversen Transkriptase

in cDNA umgewandelt werden. In der vorliegenden Studie wurden so durch Umschreibung in cDNA und anschließende RT-PCR RNA-Abschnitte vervielfältigt und quantifiziert.

Dazu musste die RNA aus isolierten ventrikulären Kardiomyozyten extrahiert werden. Zunächst wurden die Proben in Eppendorfgegläßen 20 min bei 12500 U/min und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden ihnen jeweils 400 µl des Reagenz peqGOLD TriFast von PEQLAB hinzugefügt, das eine Phasentrennung von RNA, DNA und Proteinen ermöglichte. Die Zellen wurden nun mechanisch zerstampft.

Nach Zugabe von 40 µl Chloroform erfolgte eine 5-minütige Zentrifugierung bei 12500 U/min und 4°C. Nun waren eine obere wasserklare Phase, eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase und eine dazwischenliegende Interphase sichtbar. Nur die klare Phase enthielt RNA, sie wurde in neue, sterile Eppendorfgegläße pipettiert. Diesen wurde Isopropanol in der Menge der RNA-Probe hinzugegeben. Die Gefäße wurden leicht geschüttelt und über Nacht bei -20°C eingefroren.

Danach wurden die Proben bei 12500 U/min und 4°C 10 min zentrifugiert und der entstehende Überstand abgegossen. Nach Zugabe von 1 ml Ethanol (70 %) erfolgte eine erneute 10-minütige Zentrifugierung bei 12500 U/min und 4°C. Das Ethanol wurde verworfen und die Proben eine Stunde bei Raumtemperatur trocknen gelassen.

Nun wurden jeweils 15 µl sterilen Wassers hinzugegeben, die Eppendorfgegläße kurz zentrifugiert und bei -20°C eingefroren.

3.5.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde mit dem UV/Vis-Spektralphotometer Nano Drop ND-1000 durchgeführt. Dazu wurden 2 µl der jeweiligen Probe auf den

Sensor des Gerätes pipettiert und die Messung gestartet. Die bestimmten Werte wurden in ng/μl angegeben.

3.5.3 Umwandlung der RNA in cDNA

Vor Beginn der cDNA-Synthese wurden die Eppendorfgefäße mit den Proben 5 min mit UV-Licht bestrahlt.

Für das weitere Vorgehen war 1 μg RNA pro ml Probe nötig; da die RNA-Konzentrationen (C, angegeben in ng/μl) jedoch schwankten, wurde das zu entnehmende Probenvolumen (V, angegeben in μl) mittels der Formel $\frac{1000}{C} = V$ bestimmt. Dieses Volumen wurde jeweils mit aqua bidestillata auf 5 μl aufgefüllt. Die Proben wurden nun zur Denaturierung 10 min bei 60°C in den Thermocycler gegeben.

Anschließend wurden den Proben 5 μl der cDNA-Mischung, die unter anderem die zur Umwandlung benötigte Reverse Transkriptase enthielt, hinzugefügt und sie wurden zur cDNA-Synthese eine Stunde bei 37°C in den Thermocycler gegeben, woraufhin ein 5-minütiges Erhitzen auf 95°C folgte, um die entstandene cDNA zu denaturieren und die Aktivität der Reversen Transkriptase zu beenden. Die Proben wurden bei -20°C eingefroren.

cDNA-Mischung:

5xRT-Puffer	2,0 μl
Oligo-dt	1,0 μl (0,1 mg/ml)
dNTP	1,0 μl (10 mmol/l pro Nukleotid)
DTT	0,5 μl (100 mmol/l)
RNasin	0,2 μl (25 U/μl)
M-MLV-RT	0,3 μl (200 U/μl)

3.5.4 Gelelektrophorese der cDNA-Fragmente

Zur (indirekten) visuellen Darstellung der in der RT-PCR detektierten cDNA-Amplifikate wurde eine Elektrophorese an einem Agarosegel durchgeführt.

1,1 g Agarose wurden in 75 ml kochenden 1xTAE-Puffers gelöst und es wurden 3,75 µl des Färbemittels SYBR Safe hinzugegeben. Die Flüssigkeit wurde nun in eine Gelelektrophoresekammer gegossen und es wurde ein Profilformer eingesetzt, der nach dem Aushärten wieder entfernt wurde. Die Kammer wurde mit 1xTAE-Puffer gefüllt und es wurden jeweils 10 µl der zuvor mit 2 µl Auftragspuffer gemischten Proben in die Taschen gegeben, wobei in die erste Tasche ein Längenmarker pipettiert wurde. Die Elektrophorese wurde mit 75 V bei einer Dauer von 30 min vorgenommen. Anschließend konnten die Banden unter UV-Licht bei 366 nm sichtbar gemacht werden.

10xTAE-Puffer:

Tris-Acetat	40 mmol/l
EDTA	1 mmol/l

Auftragspuffer:

10xTAE-Puffer	1 ml
Glycerin	0,5 ml
Bromphenolblau	1/10 Spatelspitze

Längenmarker:

100 bp DNA ladder	5 µl
Auftragspuffer	10 µl
1xTAE-Puffer	58 µl

3.6 Rattenzytokinarray

Um die in Überständen kardialer Progenitorzellen vorkommenden Zytokine zu detektieren, wurde das RayBio Rat Cytokine Antibody Array 1 von RayBiotech verwendet. Dadurch, dass spezifische Antikörper bereits auf einer Nitrozellulosemembran angeordnet sind, erlaubt es die Untersuchung von Proben auf 19 verschiedene Zytokine in einem Versuch. Neben den Membranen werden alle benötigten Chemikalien sowie eine Multischale mit acht Kammern mitgeliefert, so dass bis zu acht Membranen, also auch acht verschiedene Proben, gleichzeitig untersucht werden können.

Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler vorgenommen.

Zunächst wurde die Nitrozellulosemembran mit der antikörperbeschichteten Seite nach oben auf die Multischale platziert und für 30 min mit 2 ml Blockungspuffer inkubiert. Danach wurde 1 ml des zu untersuchenden Überstandes auf die Membran pipettiert und eine Inkubationszeit von 2 Stunden eingehalten.

Der Überstand wurde nun verworfen und die Membran jeweils zweimal 5 min mit Waschpuffer I und Waschpuffer II behandelt.

Das mitgelieferte Röhrchen mit biotinkonjugierten Antikörpern wurde mit 100 µl Blockungspuffer gefüllt; nach dem Mischen wurde der Inhalt in ein Gefäß mit 2 ml Blockungspuffer transferiert. Von dieser Lösung wurde 1 ml auf die Membran pipettiert, die daraufhin 2 Stunden mit den Antikörpern inkubiert und anschließend wie oben beschrieben gewaschen wurde.

Dann wurde das mit Blockungspuffer auf $1/1000$ verdünnte Streptavidin auf die Membran gegeben, es erfolgten erneut eine zweistündige Inkubation und ein Waschvorgang.

Zur Detektion der Antikörper wurde die Membran 2 min mit jeweils 250 µl der Detektionspuffer C und D inkubiert, danach auf eine Glasplatte gelegt und mit einer Plastikfolie abgedeckt; eventuelle Luftblasen wurden vorsichtig entfernt.

Die nun folgende Chemilumineszenzreaktion folgte der in 3.4.4, die Analyse der in 3.4.5 beschriebenen Methode.

3.7 Erfassung von Hypertrophie in Kardiomyozyten

Für die Erfassung von Hypertrophie wurden mittels des elektronischen Mikroskops Keyence Biozero BZ-8000 und der Software BZ Observation Kardiomyozyten in ihren Kulturschalen fotografiert. Anschließend wurden mit dem Programm BZ Analyzer die Länge und Breite aller morphologisch intakten Zellen auf den Aufnahmen ausgemessen. Aus ihnen konnte unter der Annahme einer Zylinderform und der Breite der Zelle als Radius r mit der Formel $A = \pi r^2$ die Querschnittsfläche A einer Herzmuskelzelle berechnet werden (*cross sectional area*, CSA). Eine Zunahme der Querschnittsfläche galt als Hinweis auf Hypertrophie, eine Abnahme ließ auf einen antihypertrophen Effekt schließen.

3.8 Erfassung von Apoptose und Nekrose in Kardiomyozyten

Zur Einschätzung der Apoptose- und Nekroseraten wurden die Zellen unter repräsentativen Bedingungen, das heißt 24 Stunden nach dem Ausplattieren, einem Apoptoseassay unterzogen. Dabei kamen zwei Farbstoffe zum Einsatz: Hoechst 33258, das die Zellmembran durchwandert und das Chromatin blau anfärbt, und Propidiumjodid, das von intakten Zellen nicht aufgenommen wird, sondern lediglich das Plasmalemm nekrotischer Zellen durchdringt und dann als rote Fluoreszenz sichtbar wird. Bei Betrachtung mit dem Fluoreszenzmikroskop Keyence Biozero BZ-

8000 ließ eine intensive hellblaue Fluoreszenz des Chromatins in Verbindung mit einer Abrundung des Zellkerns im Blaufilter daher auf eine apoptotische Zelle schließen, eine deutliche rote Fluoreszenz im Rotfilter auf eine nekrotische. Die wesentlichen Kriterien intakter Zellen waren – neben der unauffälligen Morphologie im Durchlicht – die Darstellung länglicher Zellkerne im Blaufilter und das Fehlen roter Fluoreszenzen im Rotfilter.

3.9 Statistik

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der gewonnenen Messwerte wurden einer Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA) unterzogen; zur post-hoc-Analyse wurde der Student-Newman-Keuls-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde jeweils auf $\alpha = 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1 Anteil intakter Kardiomyozyten in einer Präparation

Zur Einschätzung des Verhältnisses intakter zu apoptotischen und nekrotischen Herzmuskelzellen derselben Präparation wurde ein Assay durchgeführt, anhand dessen die Vitalität der Zellen erkannt werden konnte. Abbildung 4.1 zeigt ein repräsentatives Gesichtsfeld im Fluoreszenzmikroskop im Durchlicht sowie im Blau- und Rotfilter.

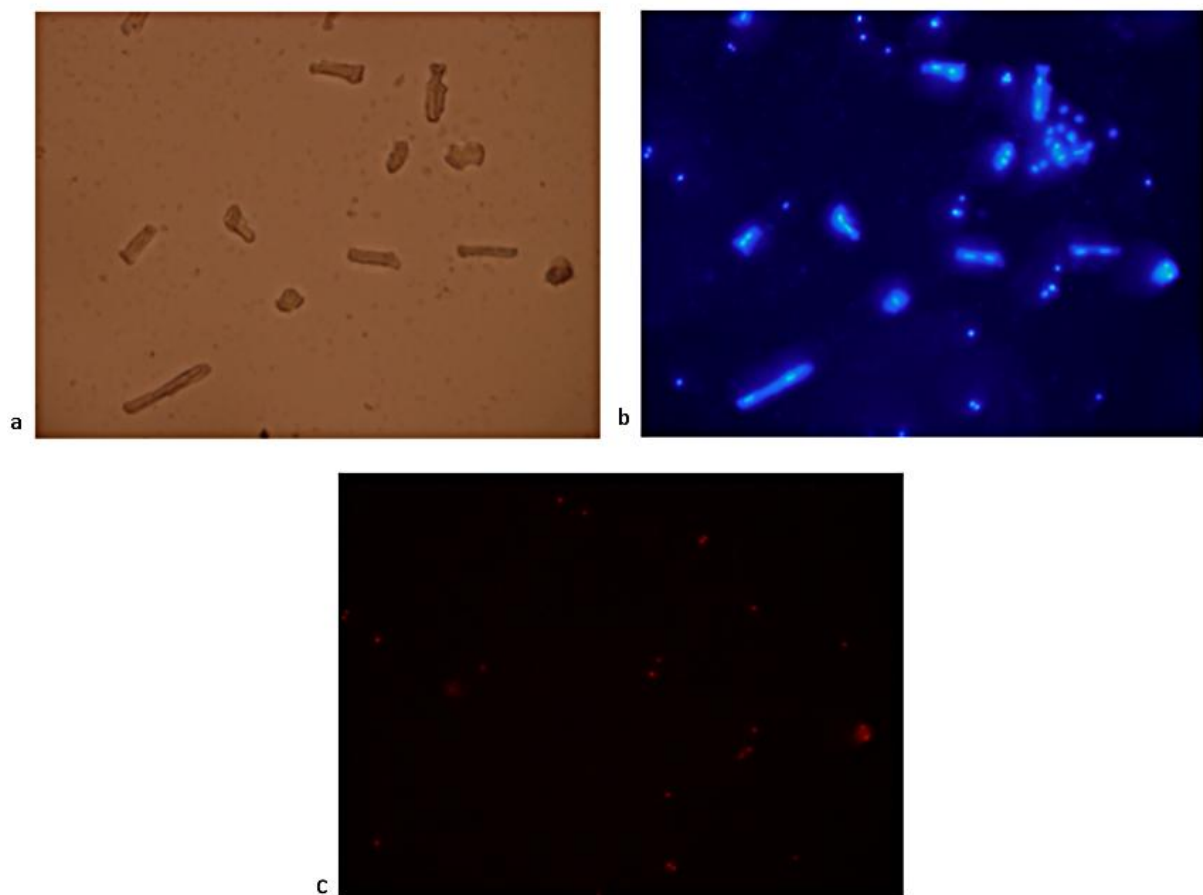


Abbildung 4.1: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen isolierter Kardiomyozyten im Durchlicht (a), Blaufilter (b) und Rotfilter (c).

Der überwiegende Teil der Zellen stellte sich, wie in Abbildung 4.1 zu sehen ist, stäbchenförmig und morphologisch unauffällig dar und ließ im Blaufilter (Abbildung 4.1 b) längliche Zellkerne als Zeichen zellulärer Integrität erkennen. Im Rotfilter (Abbildung 4.1 c) war Fluoreszenz innerhalb der Kardiomyozyten kaum auszumachen.

4.2 Expression von VEGF und seiner Rezeptoren in Kardiomyozyten

Durch die PCR wurde die Expression von VEGFR-1 und VEGFR-2 sowie VEGF in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Zusätzlich erfolgte der Nachweis der Expression von VEGFR-1 und VEGFR-2 auf Proteinebene mittels Western Blot.

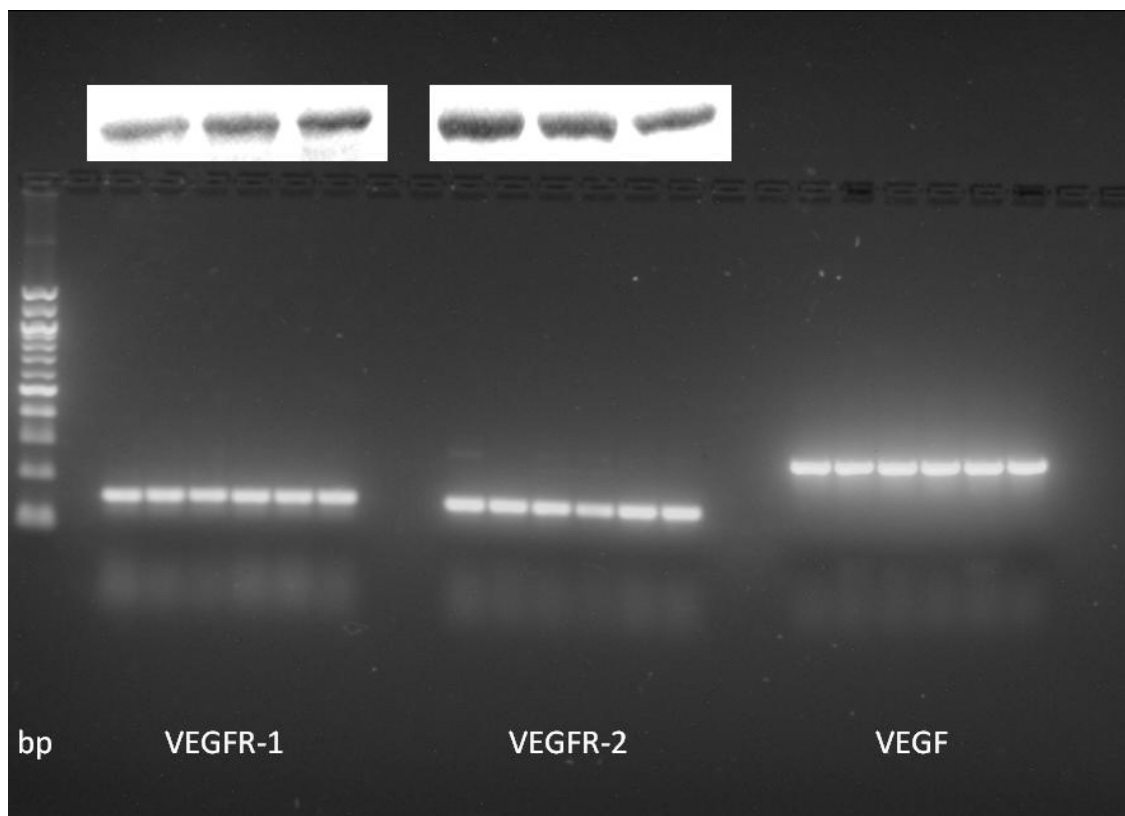
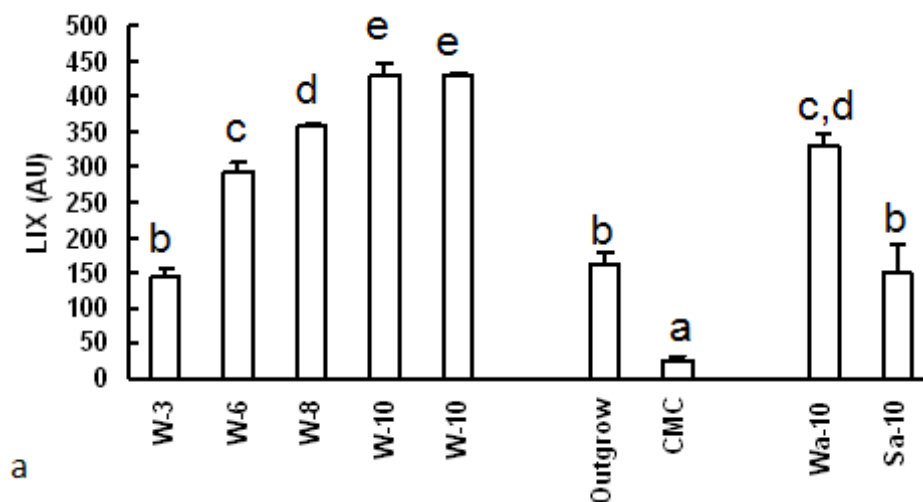
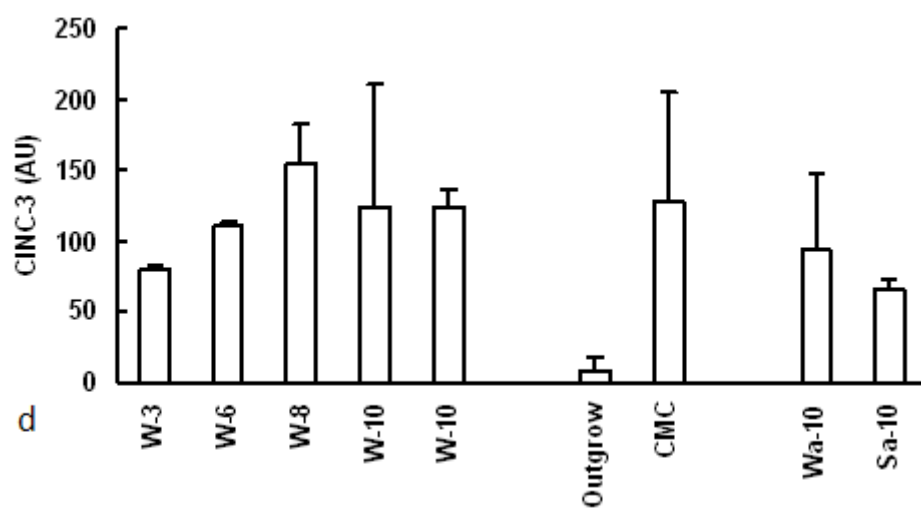
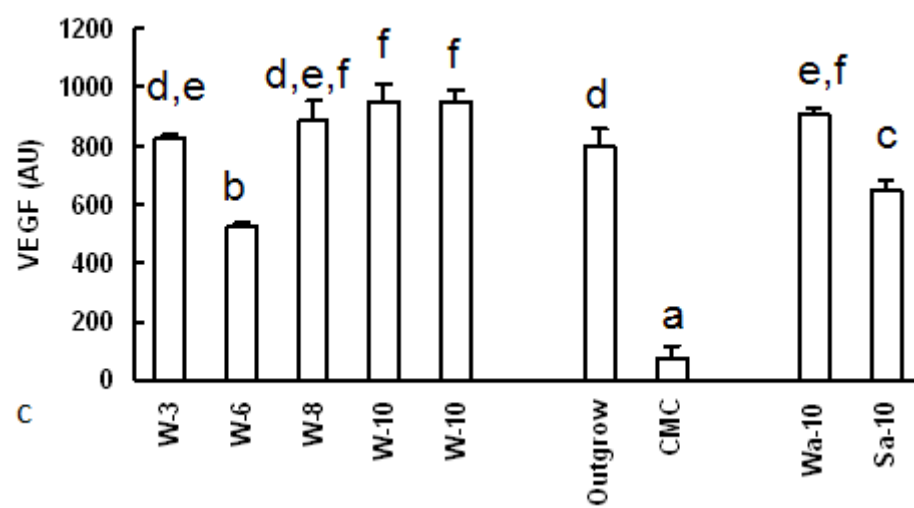
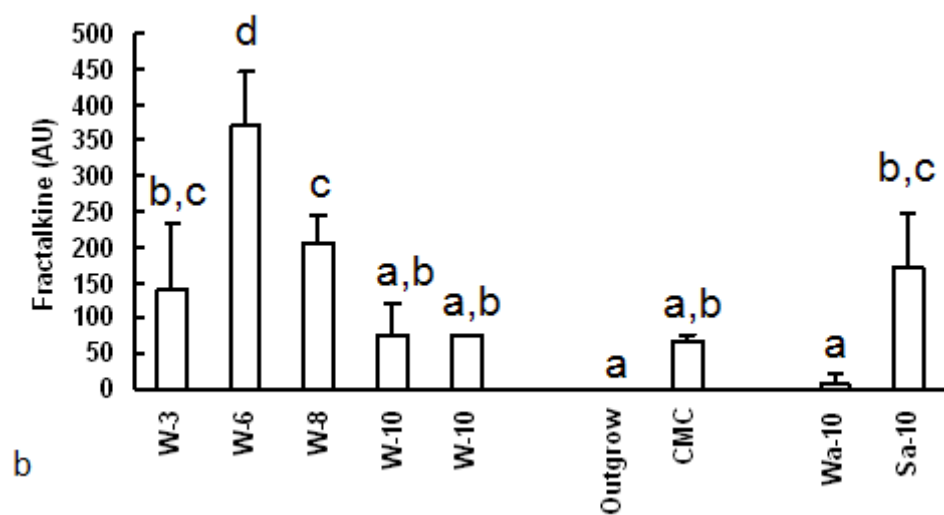


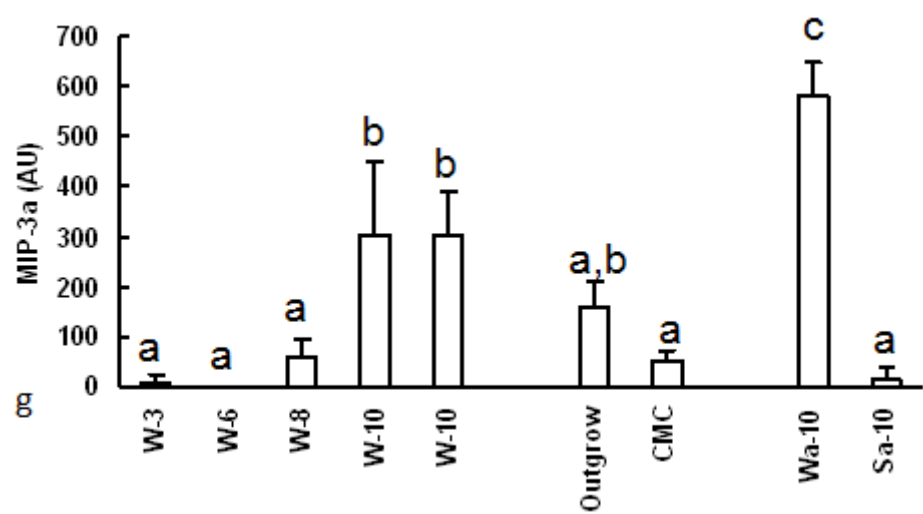
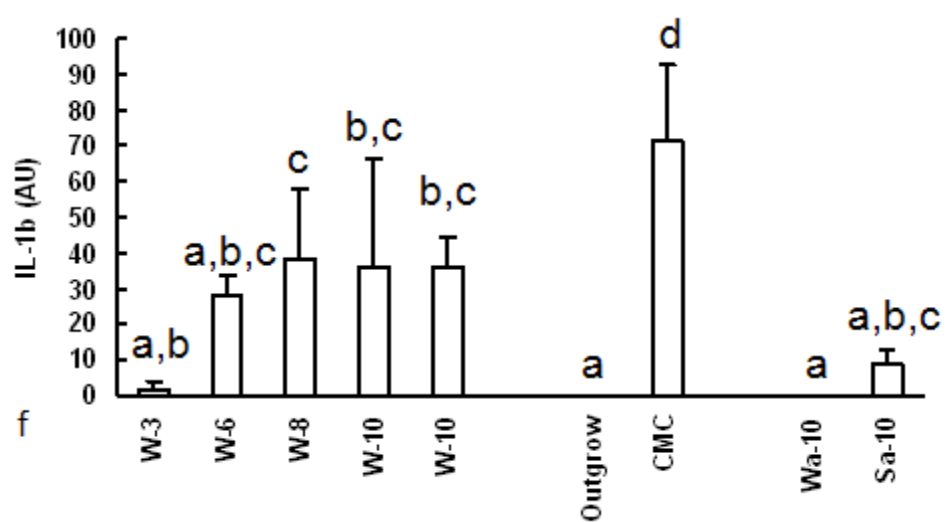
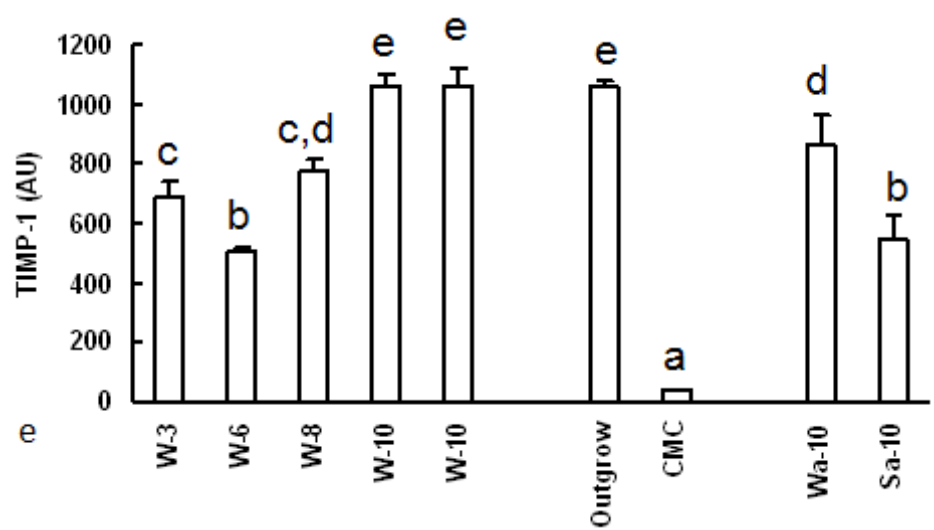
Abbildung 4.2: Agarosegel mit Nachweis der Expression von VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGF auf mRNA-Ebene in Proben aus mehreren Präparationen. Für VEGFR-1 und VEGFR-2 sind exemplarisch auch Banden aus dem Western Blot zum Nachweis der Expression auf Proteinebene dargestellt.

4.3 Zytokinsekretion kardialer Progenitorzellen

Es wurde ein Rattenzytokinarray eingesetzt, um die von kardialen Progenitorzellen sezernierten Zytokine in deren Überständen zu detektieren und zu quantifizieren. Durch Verwendung von Überständen zu verschiedenen Zeitpunkten konnte so der zeitliche Verlauf der Sekretion geprüft werden. In Abbildung 4.3 wird die Sekretion der wesentlichen Zytokine grafisch dargestellt und mit derjenigen von adulten ventrikulären Herzmuskelzellen der Ratte verglichen. Abbildung 4.3 zeigt die Menge der im Überstand detektierten Zytokine aus kardialen Progenitorzellen aus jungen (3 Monate) normotensiven Wistar-Ratten an den Tagen 3, 6, 8 und 10 (W-3, W-6, W-8, W-10) nach Überführung in Differenzierungsmedium und vor der Differenzierung in myozytenähnliche Zellen (outgrow). Die Werte für terminal differenzierte ventrikuläre Herzmuskelzellen (CMC) aus altersgleichen Tieren sind vergleichend dargestellt. Wa-10 und Sa-10 stehen für Überstände kardialer Progenitorzellen an Tag 10 aus alten (10 Monate) normotensiven Wistar-Ratten (Wa) oder spontan hypertensiven Ratten (Sa).







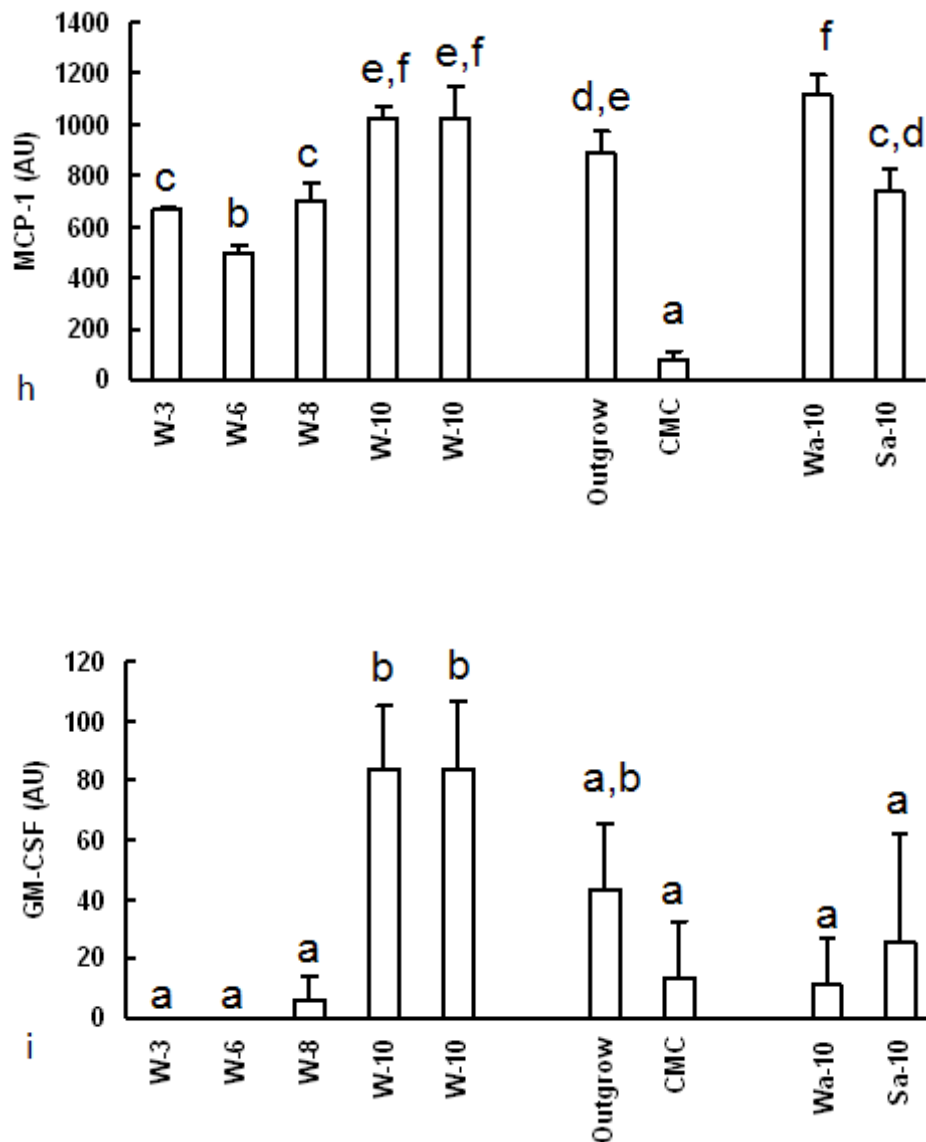


Abbildung 4.3: Darstellung der Sekretion der wichtigsten Zytokine kardialer Progenitorzellen in den jeweiligen Überständen und Medien. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichung. Gleiche Kleinbuchstaben bezeichnen Gruppen ohne statistisch signifikante Differenz in der Sekretion.

Die Analyse ergab eine quantitativ besonders intensive und zeitlich konstante oder zunehmende Sekretion von LIX, VEGF, TIMP-1 und MCP-1. Bei der für diese Arbeit besonders interessierenden Freisetzung von VEGF fällt auf, dass terminal differenzierte Herzmuskelzellen im Gegensatz zu kardialen Progenitorzellen trotz nachgewiesener Expression (siehe Abbildung 4.2) kaum VEGF sezernieren.

4.4 VEGF-vermittelte Aktivierung von MAP-Kinasen

Ein Slot Blot sollte über die Aktivierung von MAP-Kinasen durch VEGF Aufschluss geben. Dazu wurde eine Gruppe Zellen mit VEGF allein in der Konzentration 50 ng/ml und jeweils eine Gruppe zusätzlich mit den VEGF-Rezeptorblockern Flt₂₋₁₁ (blockiert VEGFR-1) und VI (blockiert VEGFR-2), beide in der Konzentration 1 µg/ml, behandelt. Die Inkubation erfolgte unter jeder Bedingung für 0, 5, 15, 30 und 60 min.

Es wurde das Verhältnis von phosphorylierter zu nicht phosphorylierter Form von JNK, p42 und p38 gewertet. Die größten Änderungen sind Abbildung 4.4 zu entnehmen.

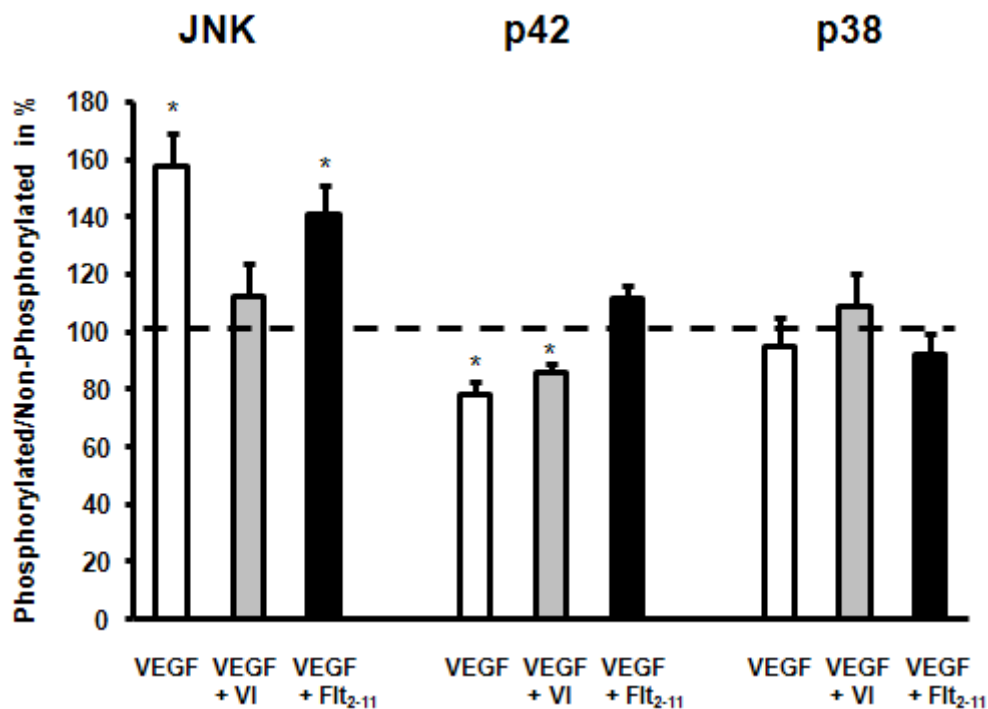


Abbildung 4.4: Prozentuales Verhältnis von phosphorylierter zu nicht phosphorylierter Form der MAP-Kinasen JNK, p42 und p38 nach 15-minütiger Inkubation mit VEGF und, je nach Gruppe, selektiver Blockierung des VEGFR-1 (durch Flt₂₋₁₁) beziehungsweise VEGFR-2 (durch VI). * = p < 0,05.

Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung der JNK in der VEGF-Gruppe, die durch Blockierung des VEGFR-2 durch das Molekül VI weitgehend

aufgehoben werden konnte. Dagegen blieb bei Blockierung des VEGFR-1 durch Flt₂₋₁₁ eine signifikante Zunahme des Phosphorylierungsgrades erhalten.

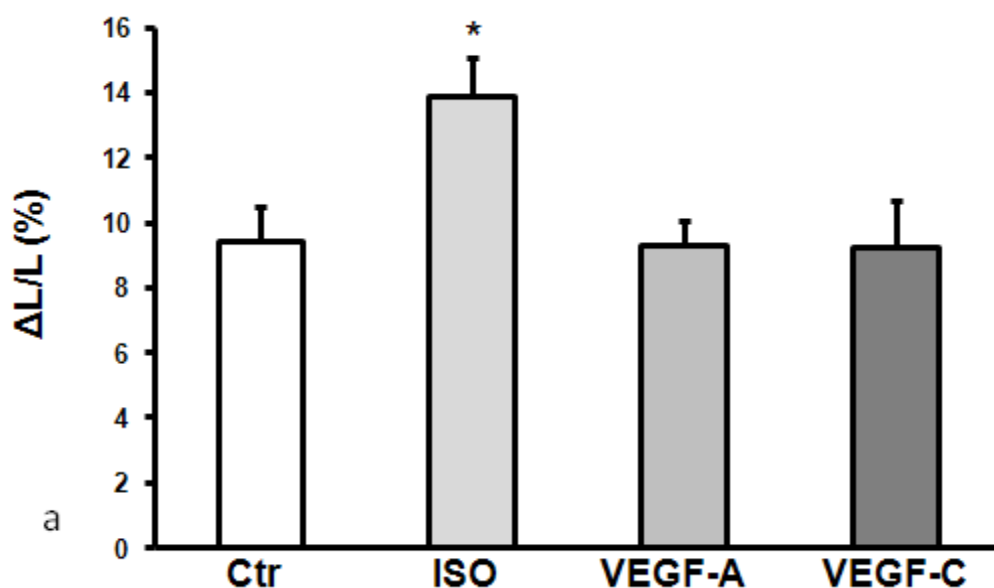
Die Phosphorylierung von p42 nahm durch VEGF leicht, jedoch statistisch signifikant, ab. Dieser Effekt konnte durch Blockierung des VEGFR-1, nicht jedoch des VEGFR-2, aufgehoben werden.

Es konnte in keiner Gruppe eine Beeinflussung der Phosphorylierung von p38 beobachtet werden.

4.5 Einfluss von VEGF auf das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten

4.5.1 Akuteffekte

Zur Erfassung von Akuteffekten wurden die Versuchszellen nach dem Ausplattieren und Waschen unmittelbar vor Beginn der Messung mit VEGF-A beziehungsweise VEGF-C, jeweils in der Konzentration 50 ng/ml, stimuliert. Als Positivkontrolle diente das β -Adrenergikum Isoprenalin (10 nM). Abbildung 4.5 zeigt Akuteffekte bei einer Kontraktionsfrequenz von 2 Hz.



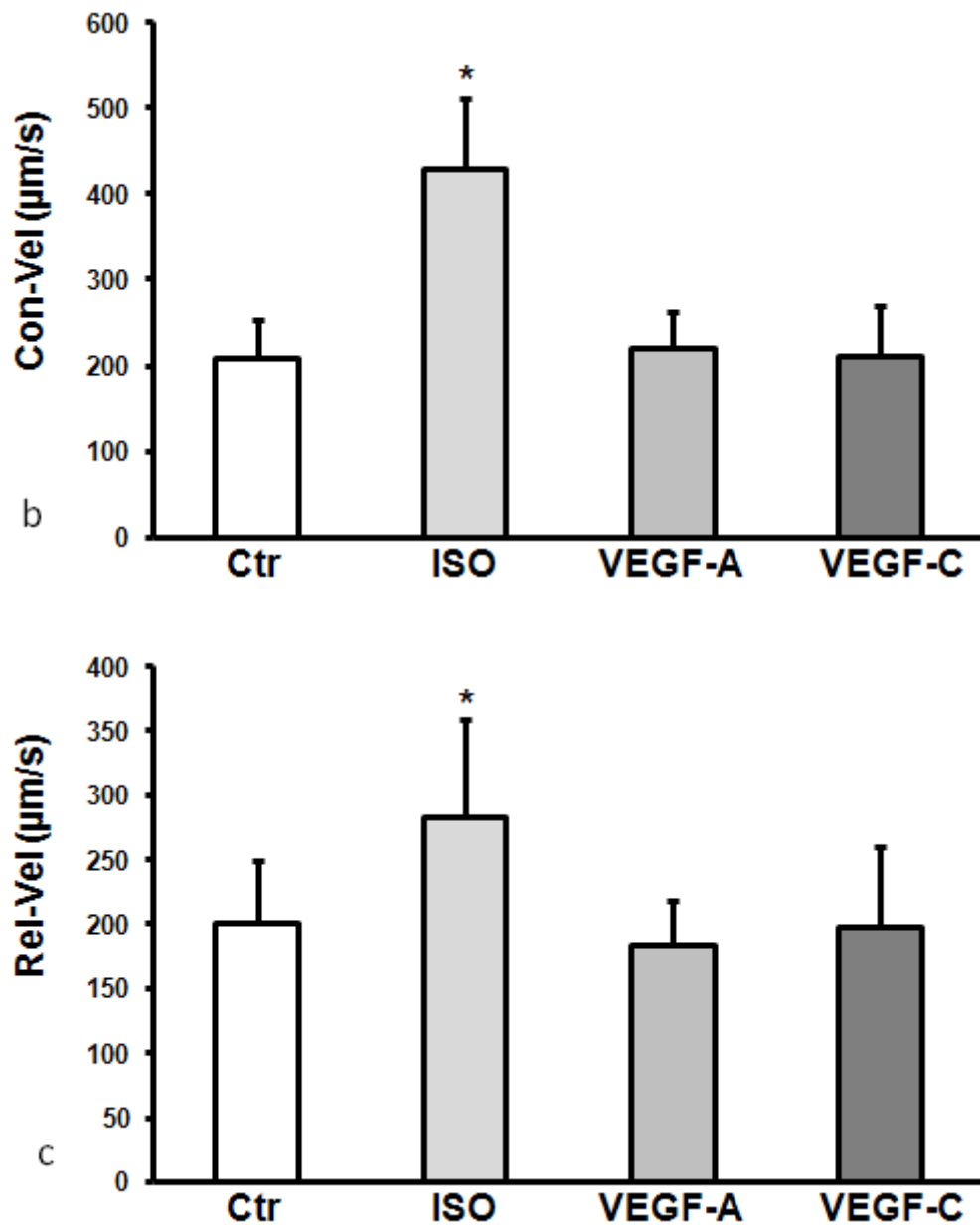


Abbildung 4.5: Darstellung der maximalen Zellverkürzung (a), der maximalen Kontraktions- (b) und Relaxationsgeschwindigkeit der Kontrollgruppe (Ctr) sowie nach Stimulation mit Isoprenalin (ISO), VEGF-A und VEGF-C bei 2 Hz. $n = 24$, * = $p < 0,05$.

Während die Zellen aus der Isoprenalingruppe deutliche Steigerungen der maximalen Kontraktion sowie der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit gegenüber der Kontrollgruppe zeigten, war weder unter Stimulation mit VEGF-A noch mit VEGF-C eine Akutwirkung zu beobachten. Auch bei den Frequenzen 1 Hz und 0,5 Hz war kein signifikanter Einfluss von VEGF-A und VEGF-C auf das Kontraktionsverhalten

festzustellen, während sich unter Isoprenalin eine frequenzabhängige Zunahme der Kontraktilität beobachten ließ, wie Abbildung 4.6 zeigt.

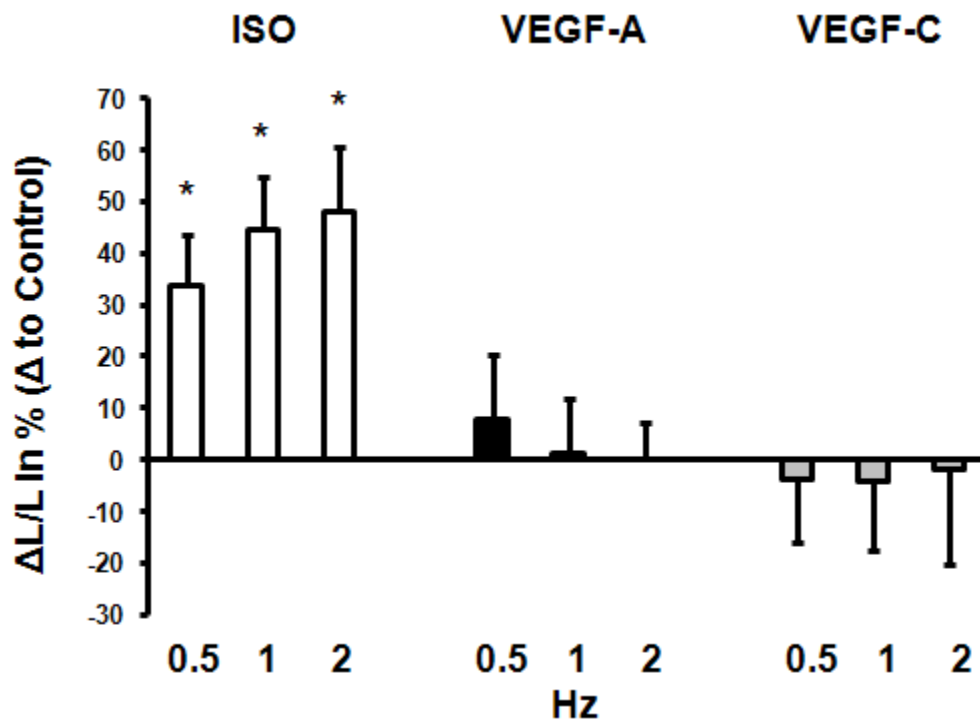


Abbildung 4.6: Frequenzabhängigkeit der maximalen Kontraktion unter Stimulation mit Isoprenalin (ISO), VEGF-A und VEGF-C. Dargestellt ist die relative Differenz zur Kontrollgruppe. n = 24, * = p < 0,05.

4.5.2 Langzeiteffekte

Für die Untersuchung von Langzeiteffekten wurden die Messungen 24 Stunden nach Stimulation der Zellen durchgeführt. Auch hier wurden VEGF-A und VEGF-C in der Konzentration 50 ng/ml verwendet. 4.7 zeigt die Langzeitwirkungen.

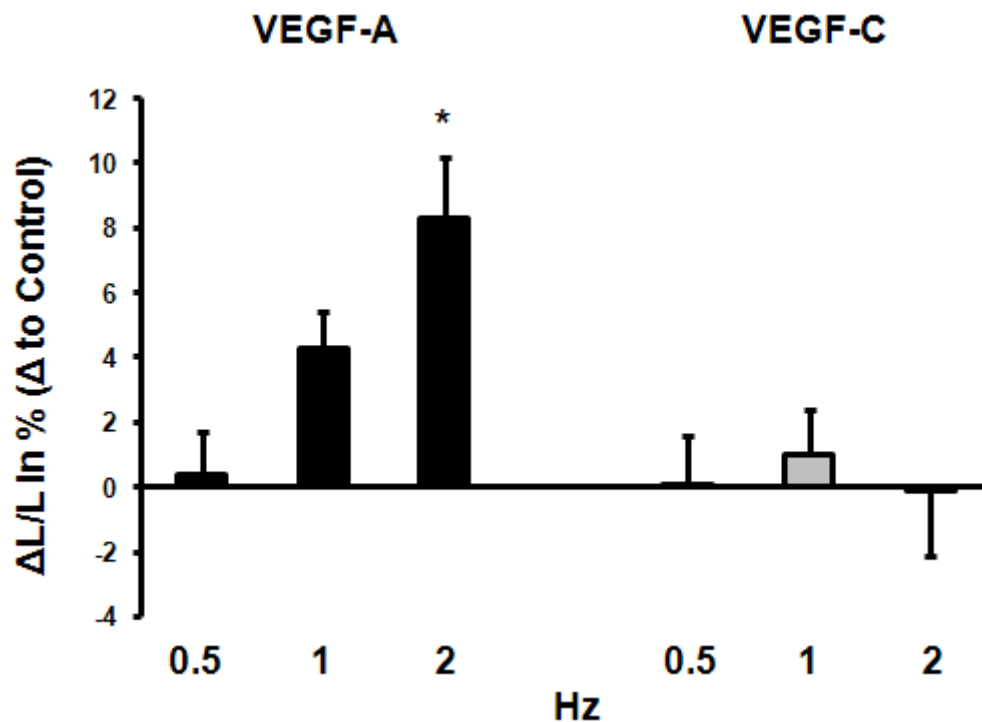


Abbildung 4.7: Langzeitwirkungen von VEGF-A und VEGF-C auf die maximale Kontraktion adulter Kardiomyozyten als relative Differenz zur Kontrollgruppe. n = 24, * = p < 0,05.

Während für VEGF-C auch nach 24 Stunden kein Einfluss auf das Kontraktionsverhalten von Herzmuskelzellen nachzuweisen war, war hier eine positive Wirkung von VEGF-A zu beobachten. Insgesamt ergab sich eine Tendenz zur frequenzabhängigen Steigerung der maximalen Zellverkürzung, wobei diese erst bei 2 Hz statistische Signifikanz erlangte.

4.5.3 Rezeptorabhängigkeit der Langzeiteffekte von VEGF

Um die rezeptorspezifische Wirkung von VEGF auf das Kontraktionsvermögen adulter Kardiomyozyten 24 Stunden nach Stimulation zu untersuchen, wurden die VEGF-Rezeptoren der Zellen selektiv pharmakologisch blockiert. Es wurde Flt₂₋₁₁ für die Blockierung des VEGFR-1 und VI für die Blockierung des VEGFR-2 eingesetzt.

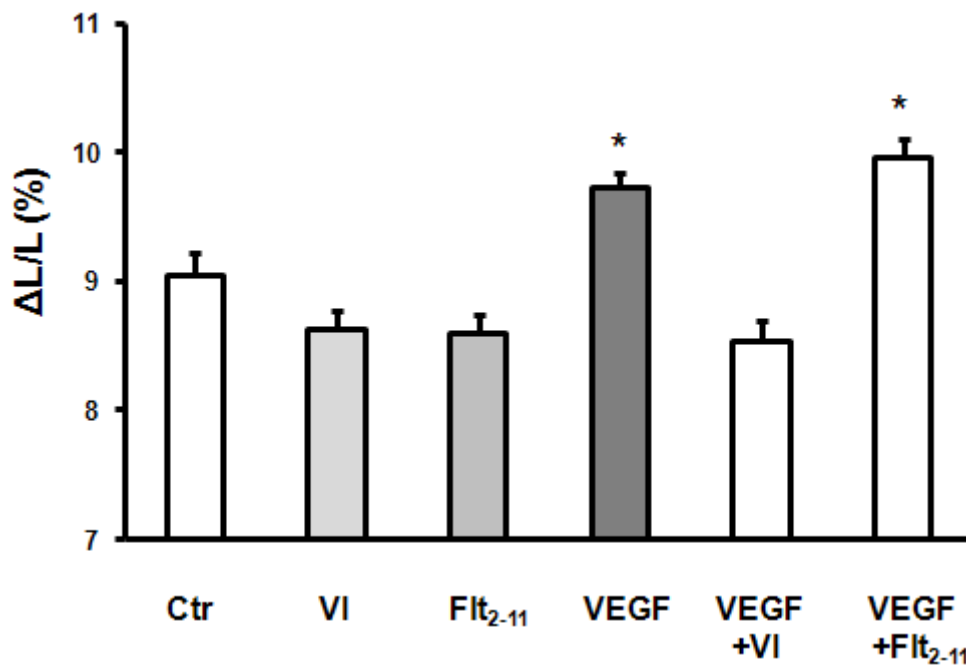


Abbildung 4.8: Maximale Kontraktion adulter Kardiomyozyten bei 2 Hz in der Kontrollgruppe (Ctr), unter Einfluss der Rezeptorblocker VI und Flt₂₋₁₁ sowie nach Stimulation mit VEGF mit und ohne vorherige Blockierung der Rezeptoren 1 beziehungsweise 2. n = 32, * = p < 0,05.

Es zeigte sich 24 Stunden nach Stimulation eine signifikante Zunahme der maximalen Zellverkürzung unter VEGF, die durch Blockierung des VEGFR-2 mit dem Molekül VI vollständig aufgehoben werden konnte. Eine Blockierung des VEGFR-1 mit Flt₂₋₁₁ bei Behandlung mit VEGF blieb folgenlos. Zwischen der Kontrollgruppe und den mit den Rezeptorblockern allein behandelten Gruppen gab es keinen signifikanten Unterschied in der Kontraktilität. Zur Darstellung einer Konzentrationsabhängigkeit wurden auch Messungen mit VEGF in der Konzentration 25 ng/ml durchgeführt.

4. Ergebnisse

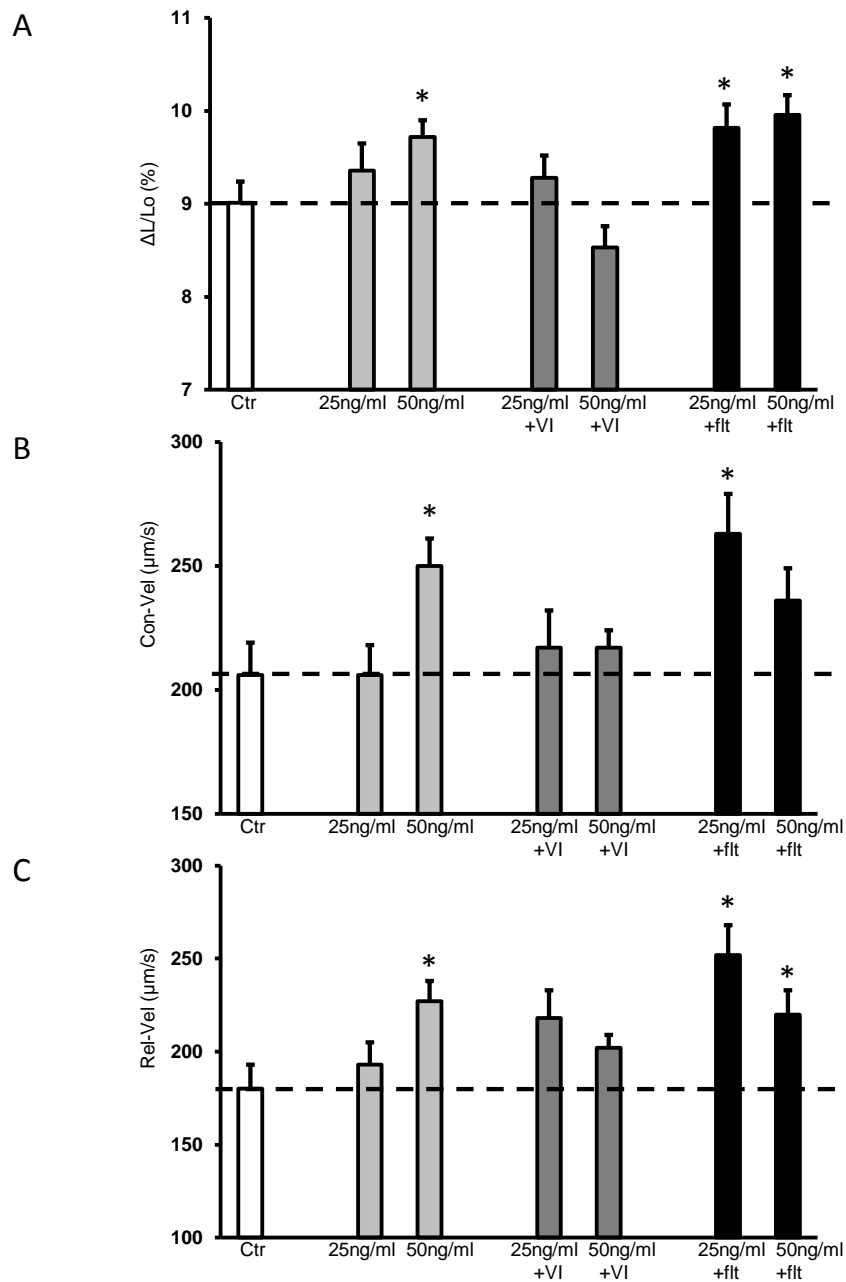


Abbildung 4.9: Einfluss von VEGF in den Konzentrationen 25 ng/ml und 50 ng/ml auf die Kontraktilität (A), die Kontraktionsgeschwindigkeit (B) und die Relaxationsgeschwindigkeit (C) von Kardiomyozyten.

Als pharmakologisch wirksame Konzentration haben sich 50 ng/ml erwiesen. Auffällig ist, dass unter Blockierung des VEGFR-1 durch Flt₂₋₁₁ signifikante Effekte schon mit 25 ng/ml zu beobachten sind.

4.5.4 Abhängigkeit der VEGF-Langzeiteffekte von der JNK

Zur Untersuchung des Einflusses der JNK auf das Kontraktionsvermögen von Kardiomyozyten wurden diese – mit und ohne Stimulation durch VEGF – mit 100 nM des JNK-Inhibitors II inkubiert.

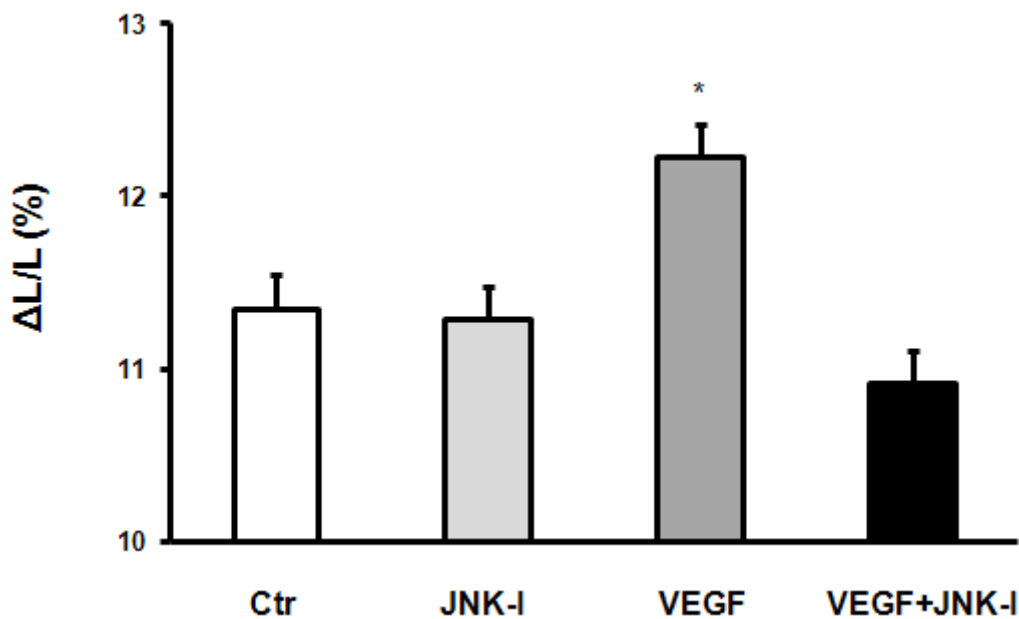


Abbildung 4.10: Maximale Kontraktion adulter Kardiomyozyten bei 2 Hz in der Kontrollgruppe (Ctr), nach Inkubation mit dem JNK-Inhibitor II (JNK-I), VEGF und VEGF+JNK-Inhibitor II. n =32, * = p < 0,05.

Der positiv kontraktile Effekt von VEGF konnte durch pharmakologische Blockierung der JNK vollständig aufgehoben werden.

4.5.5 Der Anteil von VEGF an parakrinen Wirkungen kardialer Progenitorzellen

Es wurde eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt, bei denen Kardiomyozyten 24 Stunden mit Überständen kardialer Progenitorzellen in der Konzentration 1:10000 inkubiert wurden, wobei durch das Molekül VI eine Blockierung des VEGFR-2 erfolgte.

4. Ergebnisse

Auf diese Weise sollte in Erfahrung gebracht werden, welchen Anteil VEGF am positiv kontraktile Effekt der Überstände hat.

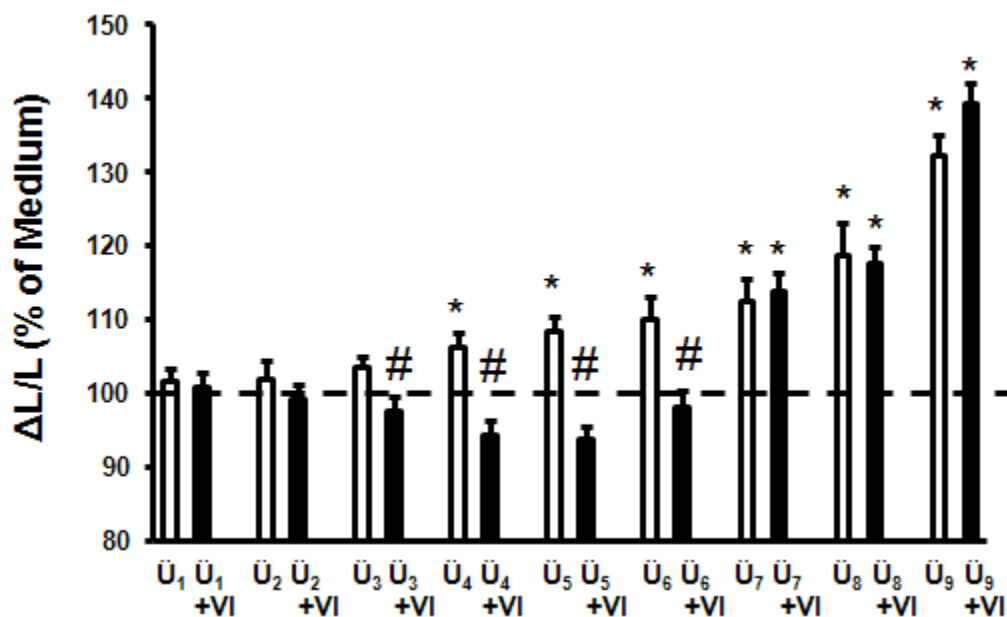


Abbildung 4.11: Maximale Kontraktion adulter Kardiomyozyten bei 2 Hz in Relation zur Kontrollgruppe nach Inkubation mit Überständen (Ü) kardialer Progenitorzellen jeweils mit und ohne VI als Blocker des VEGFR-2. n = 38, * und # = p < 0,05.

Ein signifikanter positiv kontraktile Effekt nach Inkubation mit Überständen kardialer Progenitorzellen ließ sich in 6 von 9 Messungen nachweisen. In 3 davon, sowie in einer Messung, in der die Wirkung das Signifikanzniveau verfehlte, führte die Blockierung des VEGFR-2 zu einer signifikant niedrigeren maximalen Kontraktion im Vergleich zu der mit Überständen inkubierten Gruppe. Es fällt auf, dass die Wirkung von VEGF vor allem bei moderaten Effekten zum Tragen kam, während stärkere positiv kontraktile Einflüsse durch Blockierung des VEGFR-2 nicht mehr aufzuheben waren.

4.6 Einfluss von VEGF auf das Hypertrophieverhalten von Kardiomyozyten

Neben der Wirkung auf das Kontraktionsverhalten wurde der Effekt von VEGF auf die Entwicklung von Hypertrophie von Herzmuskelzellen untersucht. Dazu wurde in einer 24-stündigen Inkubation mit FCS (100 µl/ml) Hypertrophie induziert und der Einfluss von VEGF sowie der selektiven Blockierung seiner Rezeptoren gemessen.

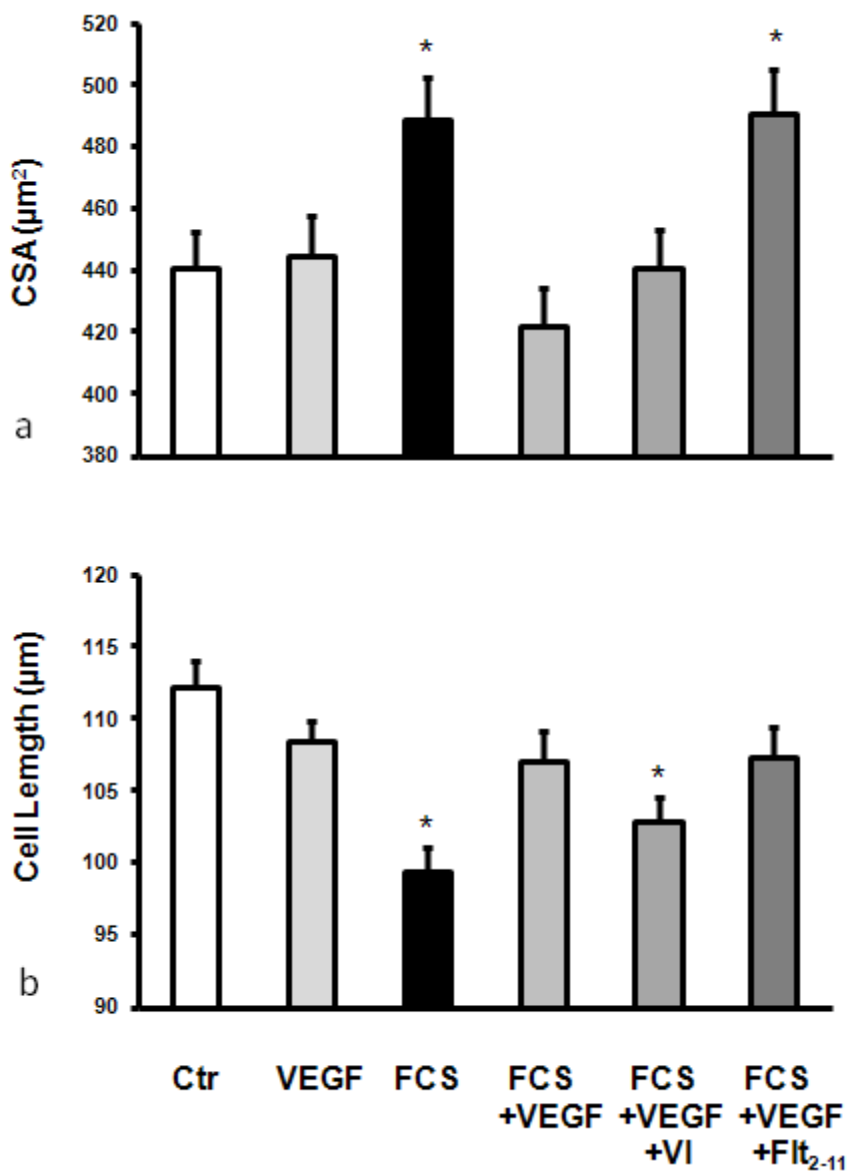


Abbildung 4.12: Darstellung der Querschnittsfläche (cross sectional area = CSA, a) und der Zelllänge (b) in der Kontrollgruppe (Ctr) sowie nach 24-stündiger Inkubation mit den genannten Substanzen.

n = ca. 200, * = p < 0,05.

Wie Abbildung 4.12 a zu entnehmen ist, führte VEGF sowohl allein als auch in Kombination mit der Blockierung des VEGFR-2 durch VI zu einer vollständigen Aufhebung der durch FCS induzierten Hypertrophie. Bei Blockierung des VEGFR-1 durch Flt₂₋₁₁ war dieser antihypertrophe Effekt nicht zu beobachten.

Die unter FCS abnehmende Zelllänge (siehe Abbildung 4.12 b) bei gleichzeitiger Zunahme der CSA lässt auf eine Hypertrophieentwicklung schließen, die durch eine starke Zunahme der Zellbreite gekennzeichnet ist. Die Verkürzung der mit FCS inkubierten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte durch VEGF aufgehoben werden, solange der VEGFR-2 nicht blockiert war. Eine Blockierung des VEGFR-1 führte hier zu keinem Effekt.

5. Diskussion

VEGF ist primär als angiogenetischer Faktor beschrieben, bei dem allerdings zunehmend Wirkungen bekannt werden, welche über die Gefäßneubildung hinausgehen. In dieser Arbeit wurde der direkte parakrine Einfluss von VEGF auf isolierte Kardiomyozyten untersucht. In diesem Rahmen wurden folgende wesentliche Befunde erhoben: adulte ventrikuläre Herzmuskelzellen der Ratte exprimieren VEGF und die beiden Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2. VEGF vermag durch Stimulation des VEGFR-2 in Abhängigkeit von der c-JNK langfristig die kardiale Funktion zu verbessern. Durch Stimulation des VEGFR-1 wird eine antihypertrophe Wirkung erzielt.

5.1 Expression von VEGF-Rezeptoren durch Kardiomyozyten

Um nachvollziehbar mit einer parakrinen Wirkung von VEGF auf Kardiomyozyten argumentieren zu können, muss der Nachweis einer entsprechenden Rezeptorexpression als Voraussetzung betrachtet werden. Daher wurden für diese Arbeit Untersuchungen mittels PCR und Western Blot durchgeführt, mit denen die Expression des VEGFR-1 und VEGFR-2 durch adulte Herzmuskelzellen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte. Eine Expression dieser Rezeptoren durch Kardiomyozyten ist bisher lediglich bei neonatalen Herzmuskelzellen beschrieben worden [71], es ist jedoch im Sinne einer umfassenden Analyse sinnvoll, sie an isolierten adulten Kardiomyozyten unter Kulturbedingungen zu bestätigen. Nachdem die Expression der beiden VEGF-Rezeptoren verifiziert worden war, konnte anschließend ihre funktionelle Kopplung in Herzmuskelzellen untersucht werden.

5.2 Einfluss auf das Kontraktionsverhalten

Eine kardiale Wirkung von VEGF wird häufig im Zusammenhang mit der parakrinen Wirkung von Stammzellen diskutiert. Eine mögliche Funktionsverbesserung könnte entweder auf Angiogenese oder auf direkter Wirkung auf die kontraktile Funktion der Herzmuskelzellen beruhen. In dieser Arbeit wurde die Hypothese getestet, dass VEGF direkt auf die Herzmuskelzellen wirkt und deren Funktion steigert.

Es konnte gezeigt werden, dass eine langfristige Exposition gegenüber VEGF-A in einer Konzentration von 50 ng/ml die mittlere Verkürzung von Herzmuskelzellen der Ratte steigert. Dieser Effekt war frequenzabhängig und erreichte bei 2 Hz statistische Signifikanz. Angesichts der physiologischen Herzfrequenz der Ratte von ungefähr 250 bis 400 Schlägen pro Minute ist diese Dynamik als günstig zu betrachten; eine noch deutlicher ausgeprägte Wirkung bei höheren Frequenzen ist somit denkbar, jedoch bislang nicht belegt. In dieser Arbeit wurden die Untersuchungen auf 2 Hz beschränkt, weil die Zellen bei Raumtemperatur stimuliert wurden und sich dadurch bei höheren Frequenzen häufig Arrhythmien ergeben. Die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten nahmen bei 2 Hz ebenfalls signifikant zu. Durch pharmakologische Blockierung des VEGFR-2 konnten diese Wirkungen vollständig aufgehoben werden. Interessant ist, dass bei Blockierung des VEGFR-1 schon eine VEGF-Konzentration von 25 ng/ml ausreichte, um die beschriebenen Effekte zu erzielen. Diese Beobachtung ist vereinbar mit dem seit längerem postulierten Phänomen, dass durch die Bindung von VEGF an den VEGFR-1, zu dem es eine höhere Affinität als zum VEGFR-2 hat, letzterem weniger VEGF-Aktivität zur Verfügung steht, um seine Wirkung ins Zellinnere zu vermitteln; dass sich der VEGFR-1 hier also als ein „Köder“ (*decoy*) für den Liganden verhält [87].

Im Gegensatz zu den langfristigen Wirkungen des VEGF konnten akute Effekte nicht festgestellt werden. Im isoprenalinkontrollierten Akutversuch zeigten sich unter dem β -Sympathomimetikum erwartungsgemäß starke Anstiege der maximalen

Zellverkürzung, der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit, während sie unter VEGF ausblieben. Für VEGF-C konnten weder im Akut- noch im Langzeitversuch signifikante Wirkungen auf Kardiomyozyten gezeigt werden. Da es hauptsächlich mit der Lymphangiogenese via VEGFR-3 in Zusammenhang gebracht wird [55–57], ist eine ausbleibende kardiale Wirkung durchaus erwartet worden. Sie wurde hier belegt und zeigt einen Unterschied zwischen verschiedenen VEGF-Isoformen.

Die 2010 erstmals beschriebene positiv kontraktile Wirkung der Überstände kardialer Progenitorzellen [50] konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Dabei wurde der Effekt in den Fällen durch einen VEGF-Rezeptorblocker relativiert, in denen die Wirkung zwar statistisch signifikant, aber numerisch nur mäßig stark ausgeprägt war. Bei deutlicheren Verstärkungen der Kontraktion konnte der Effekt durch die Blockierung von VEGF nicht mehr aufgehoben werden. So ist VEGF sicher nicht der alleinige, wohl auch nicht der wichtigste Faktor für die parakrine Kontraktilitätssteigerung von Kardiomyozyten durch Progenitorzellen. Wahrscheinlicher ist eine komplexe Interaktion verschiedener Zytokine.

Darüber hinaus ist eine mögliche Sekretion von VEGF durch differenzierte Herzmuskelzellen zu bedenken. Hierzu gibt es bislang keine Untersuchungen, da der Fokus bei Studien über kardiale Effekte von VEGF, welche über die Angiogenese hinausgehen, stets entweder auf das gesamte Myokard oder, seit kurzem, isoliert auf Progenitorzellen gerichtet wurde. In dieser Arbeit wurde eine Expression von VEGF-mRNA in adulten Kardiomyozyten mittels PCR nachgewiesen. Ein Western Blot zur Detektion einer Expression auf Proteinebene erfolgte nicht, wohl aber ein Zytokinarray, in dem die VEGF-Sekretion durch adulte Kardiomyozyten allerdings gering ausgeprägt war. Hier sollte in zukünftigen Studien angesetzt werden, da eine über HIF-1 und HIF-2 gesteuerte Freisetzung von VEGF durch Herzmuskelzellen, parallel etwa zur Sekretion aus Endothelzellen, plausibel erscheint. Gerade in Situationen myokardialer Hypoxie wäre ein solcher Mechanismus angesichts der kardioprotektiven Eigenschaften von VEGF aus pathophysiologischer Sicht denkbar und sinnvoll. So könnte – weniger im Rahmen eines akuten Koronarsyndroms als eher

bei chronischen Erkrankungen wie der KHK, der hypertensiven oder ischämischen Kardiomyopathie und letztlich der Herzinsuffizienz – eventuell eine Verbesserung der Kontraktilität, Minderung der Apptoserate und Teilkompensation der Hypertrophie von Herzmuskelzellen nicht nur parakrin, sondern auch autokrin herbeigeführt werden. Diese Vorstellung bedarf allerdings, wie erwähnt, der experimentellen Bestätigung.

5.3 Durch kardiale Progenitorzellen sezernierte Zytokine

Ein Array sollte darüber Aufschluss geben, welche Zytokine durch die Progenitorzellen sezerniert werden. VEGF gehörte dabei neben dem lipopolysaccharidinduzierten CXC-Chemokin (LIX), dem *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) und dem *tissue inhibitor of metalloproteinases-1* (TIMP-1) zu den quantitativ wichtigsten Molekülen. Kardiales LIX führt zur Infiltration des Myokards durch Neutrophile während der postischämischen Reperfusion [88], während erhöhte Werte anderer CXC-Chemokine im Blut herzinsuffizienter Patienten nachgewiesen wurden [89]. Diese Zytokingruppe kann somit eine Rolle in der inflammatorischen Komponente der Herzinsuffizienz spielen. Auch MCP-1 wird mit Reperfusionsschäden, aber auch mit Myokarditis, Abstoßungsreaktionen nach Herztransplantation sowie mit kardiomyozytärer Apoptose und ventrikulärer Dysfunktion in Verbindung gebracht [90, 91]. Die Serumkonzentration von TIMP-1 korreliert positiv mit zahlreichen kardiovaskulären Risikofaktoren und negativ mit Funktionsparametern wie der fraktionalen Zellverkürzung, was auf einen Umbau der extrazellulären Matrix in der Pathogenese der Herzinsuffizienz deutet [92, 93]. Insgesamt muss aber konstatiert werden, dass die Zahl der ausgeschütteten Faktoren sehr hoch ist und natürlich nicht davon ausgegangen werden kann, dass durch dieses Array sämtliche beteiligten Zytokine entdeckt wurden. Ihr Zusammenspiel erfordert weitere Untersuchungen. Im Speziellen wäre der parakrine Einfluss der einzelnen

Zytokine auf die Funktion von Herzmuskelzellen sowie gegebenenfalls die gegenseitige Beeinflussung dieser Moleküle in ihrer Wirkung interessant.

5.4 Intrazelluläre Signaltransduktion

Durch einen Slot Blot konnte in dieser Arbeit eine Phosphorylierung der c-JUN-N-terminalen Kinase (c-JNK) durch Aktivierung des VEGFR-2 nachgewiesen werden. Diese ist in der bisherigen Literatur nicht beschrieben worden. Bekannt ist eine VEGF-vermittelte Aktivierung der p42/44-MAP-Kinase in embryonalen Stammzellen und neonatalen Kardiomyozyten der Ratte [78, 94]. Auch eine Aktivierung des Raf-MEK-MAP-Kinase-Weges sowie der p38-MAP-Kinase durch VEGF sind beschrieben [95, 96]. In dem dieser Arbeit zu Grunde gelegten Modell konnte eine Phosphorylierung der p38-MAP-Kinase nicht beobachtet werden; die Phosphorylierung der p42-MAP-Kinase wurde sogar etwas reduziert. Aus diesen Ergebnissen lässt sich eine mögliche Vermittlung der positiv kontraktile Effekte via VEGFR-2 durch die c-JNK ableiten. Zur Überprüfung der Hypothese wurde der Einfluss von VEGF unter pharmakologischer Blockierung der c-JNK untersucht. Hierbei konnte der positiv kontraktile Effekt vollständig aufgehoben werden. Es ergibt sich somit eine durch den VEGFR-2 vermittelte Aktivierung der c-JNK mit daraus resultierender Steigerung der Kontraktilität von adulten Kardiomyozyten.

5.5 Einfluss auf das Hypertrophieverhalten

Es konnte in dieser Arbeit ein negativ hypertropher Effekt von VEGF auf Kardiomyozyten via VEGFR-1 gezeigt werden, indem eine durch FCS induzierte Größenzunahme unter gleichzeitiger Inkubation mit VEGF nicht nachzuweisen war, solange der VEGFR-1 nicht blockiert war. Die Rolle von VEGF im Rahmen des

kardialen Hypertrophieverhaltens ist umstritten, die Resultate bisheriger Studien sind uneinheitlich. So scheint es im Zusammenspiel mit Endothelin-1 prohypertroph, im Kontext einer Kupferexposition jedoch antihypertroph zu wirken; auch ein negativ hypertropher Effekt durch VEGF in Zusammenhang mit verstärktem VEGFR-1-Signalling wurde beschrieben [75–77]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie decken sich mit diesen Beobachtungen, so dass die Hypothese einer nativ negativ hypertrophen Wirkung von VEGF auf Kardiomyozyten unterstützt werden kann.

5.6 Schlussfolgerung

Die Effekte des *vascular endothelial growth factor* werden in der einschlägigen Literatur hauptsächlich auf seine Funktionen im Rahmen der Angio- oder Vaskulogenese oder die Steigerung der vaskulären Permeabilität zurückgeführt (siehe Abschnitt 1.3). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die kardiale Wirkung des VEGF nicht hierauf beschränkt ist, sondern auch direkte parakrine Wirkungen auf Kardiomyozyten umfasst.

6. Zusammenfassung

Seit der Entdeckung des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und der fortschreitenden Aufklärung seiner Effekte erlangte dieses Molekül für immer mehr medizinische Forschungsgebiete Relevanz. In jüngster Zeit hat das Interesse an der Wirkung von VEGF im Herzen zugenommen. Ziel dieser Arbeit war es zu klären, welchen Einfluss VEGF auf adulte Kardiomyozyten ausübt.

Es konnte mittels PCR und Western Blot gezeigt werden, dass die Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 durch Kardiomyozyten auf mRNA- und auf Proteinebene exprimiert werden. Über den VEGFR-2 übt VEGF im Langzeitmodell frequenzabhängig eine direkte positiv kontraktile Wirkung auf Herzmuskelzellen aus. Dabei wird, wie im Slot Blot nachgewiesen, die c-JNK phosphoryliert. Sie ist in die intrazelluläre Signaltransduktion, die zur Kontraktilitätserhöhung durch VEGF führt, eingeschaltet.

Weiterhin wurden in einem Array Zytokine identifiziert, die durch kardiale Progenitorzellen sezerniert werden. Hier gehörte VEGF zu den quantitativ bedeutendsten. Im Rahmen der bereits bekannten positiv inotropen Wirkung von Überständen kardialer Progenitorzellen konnte für VEGF in dieser Arbeit hauptsächlich bei einer mäßigen Kontraktilitätssteigerung eine Bedeutung nachgewiesen werden, nicht jedoch bei stärker ausgeprägter Beeinflussung der maximalen Verkürzung.

Durch FCS induzierte Hypertrophie von Kardiomyozyten war durch VEGF via VEGFR-1 reversibel. In dieser Arbeit kann daher der Verdacht auf einen antihypertrophen Effekt von VEGF unterstützt werden.

7. Summary

Since the discovery of the vascular endothelial growth factor (VEGF) and the progressive elucidation of its effects, this molecule became relevant for a growing number of fields of medical science. Lately, the interest in the actions of VEGF within the heart has been growing. The aim of this study was to clarify what effects VEGF exerts upon adult cardiomyocytes.

Through PCR and Western Blot, it could be demonstrated that the receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 are expressed by cardiomyocytes both as mRNA and protein. Via VEGFR-2, VEGF exerts a frequency dependent direct positive contractile effect upon cardiomyocytes in a non-acute manner. In the process, the c-JNK is phosphorylated, as was detected through Slot Blot. It is active in the intracellular signalling which leads to increased contractility caused by VEGF.

Furthermore, cytokines were identified in an array, which are secreted by cardiac progenitor cells. Here, VEGF was among the quantitatively most considerable. As to the already familiar positive inotropic effect of supernatants of cardiac progenitor cells, a role of VEGF could be shown chiefly in the context of a moderate increase of cardiomyocyte contractility, not however with regard to a greater influence of the maximum shortening.

Hypertrophy of cardiomyocytes induced by FCS was reversible by VEGF via VEGFR-1. In this study, the assumption of an antihypertrophic effect of VEGF can be supported.

8. Literaturverzeichnis

1. Dickstein, K. *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), *European Heart Journal* **29**, 2388–2442 (2008).
2. Fauci, A.S. & Harrison, T.R. *Harrison's principles of internal medicine*. 17th ed. (McGraw-Hill Medical, New York, NY, 2008).
3. Shammass RL, Khan NU, Nekkanti R & Movahed A. Diastolic heart failure and left ventricular diastolic dysfunction: what we know, and what we don't know!, *Int J Cardiol* **115**, 284–292 (2007).
4. Yamamoto K, Sakata Y, Ohtani T, Takeda Y & Mano T. Heart failure with preserved ejection fraction, *Circ J* **73**, 404–410 (2009).
5. Yuzefpolskaya M, Weinberg C & Kukin M. Advances in systolic heart failure, *F1000 Med Rep* **2**, doi:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10.3410/M2-31> (2010).
6. Triposkiadis F *et al.* The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications, *J Am Coll Cardiol* **54**, 1747–1762 (2009).
7. Knowlton KU *et al.* The alpha 1A-adrenergic receptor subtype mediates biochemical, molecular, and morphologic features of cultured myocardial cell hypertrophy, *J Biol Chem* **268**, 15374–15380 (1993).
8. Liggett SB *et al.* Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level, *Circulation* **101**, 1707–1714 (2000).
9. Zucker, I.H., Share, L. & Gilmore, J.P. Renal effects of left atrial distension in dogs with chronic congestive heart failure, *Am. J. Physiol* **236**, H554-60 (1979).

10. Ferguson, D.W., Abboud, F.M. & Mark, A.L. Selective impairment of baroreflex-mediated vasoconstrictor responses in patients with ventricular dysfunction, *Circulation* **69**, 451–460 (1984).
11. Inoue H, Skale BT & Zipes DP. Effects of ischemia on cardiac afferent sympathetic and vagal reflexes in dog, *Am J Physiol* **255**, H26-35 (1988).
12. Wang W & Ma R. Cardiac sympathetic afferent reflexes in heart failure, *Heart Fail Rev* **5**, 57–71 (2000).
13. Watson, A.M., Hood, S.G. & May, C.N. Mechanisms of sympathetic activation in heart failure, *Clin Exp Pharmacol Physiol* **33**, 1269–1274 (2006).
14. Brouri F *et al.* Blockade of beta 1- and desensitization of beta 2-adrenoceptors reduce isoprenaline-induced cardiac fibrosis, *Eur J Pharmacol* **485**, 227–234 (2004).
15. Colucci WS, Sawyer DB, Singh K & Communal C. Adrenergic overload and apoptosis in heart failure: implications for therapy, *J Card Fail* **6**, 1–7 (2000).
16. Park M, S.Y.G.V.H.G.B.J.R.R.N.F.K.R.V.D.V.S. Apoptosis predominates in nonmyocytes in heart failure., *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, H785-H791 (2009).
17. Gelpi, R.J. *et al.* Apoptosis in severe, compensated pressure overload predominates in non-myocytes and is related to the hypertrophy but not function, *AJP: Heart and Circulatory Physiology* (2010).
18. Silvestre JS *et al.* Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis, *Circulation* **99**, 2694–2701 (1999).
19. Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI & Fabiani ME. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function, *Clin Sci (Lond)* **100**, 481–492 (2001).

20. Young, M.J. & Funder, J.W. Mineralocorticoid receptors and pathophysiological roles for aldosterone in the cardiovascular system, *J. Hypertens* **20**, 1465–1468 (2002).
21. Schlüter, K.-D. & Wenzel, S. Angiotensin II: a hormone involved in and contributing to pro-hypertrophic cardiac networks and target of anti-hypertrophic cross-talks, *Pharmacol. Ther* **119**, 311–325 (2008).
22. Mufti, S., Wenzel, S., Euler, G., Piper, H.M. & Schlüter, K.-D. Angiotensin II-dependent loss of cardiac function: mechanisms and pharmacological targets attenuating this effect, *J. Cell. Physiol* **217**, 242–249 (2008).
23. Blum, A. & Miller, H. Pathophysiological role of cytokines in congestive heart failure, *Annu. Rev. Med* **52**, 15–27 (2001).
24. Vasan RS *et al.* Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study, *Circulation* **107**, 1486–1491 (2003).
25. Haugen, E. *et al.* Parallel gene expressions of IL-6 and BNP during cardiac hypertrophy complicated with diastolic dysfunction in spontaneously hypertensive rats, *Int. J. Cardiol* **115**, 24–28 (2007).
26. Barton PJ *et al.* Increased expression of extracellular matrix regulators TIMP1 and MMP1 in deteriorating heart failure, *J Heart Lung Transplant* **22**, 738–744 (2003).
27. Bradham WS, Bozkurt B, Gunasinghe H, Mann D & Spinale FG. Tumor necrosis factor-alpha and myocardial remodeling in progression of heart failure: a current perspective, *Cardiovasc Res* **53**, 822–830 (2002).
28. Bradham WS *et al.* TNF-alpha and myocardial matrix metalloproteinases in heart failure: relationship to LV remodeling, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**, H1288–95 (2002).
29. Wu CK *et al.* Plasma levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 are associated with diastolic heart failure through downregulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase, *Crit Care Med* (2011).

30. Smart N *et al.* IL-6 induces PI 3-kinase and nitric oxide-dependent protection and preserves mitochondrial function in cardiomyocytes, *Cardiovasc Res* **69**, 164–177 (2006).
31. Wang Y *et al.* TGF- α increases human mesenchymal stem cell-secreted VEGF by MEK- and PI3-K- but not JNK- or ERK-dependent mechanisms, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**, R1115-23 (2008).
32. Herrmann, J.L. *et al.* IL-6 and TGF- α Costimulate Mesenchymal Stem Cell VEGF Production by ERK, JNK, and PI3K-Mediated Mechanisms, *Shock (Augusta, Ga.)* (2011).
33. Tang J *et al.* Mesenchymal stem cells over-expressing SDF-1 promote angiogenesis and improve heart function in experimental myocardial infarction in rats, *Eur J Cardiothorac Surg* **36**, 644–650 (2009).
34. Herrmann JL *et al.* Postinfarct intramyocardial injection of mesenchymal stem cells pretreated with TGF- α improves acute myocardial function, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **299**, R371-8 (2010).
35. Herrmann JL *et al.* Preconditioning mesenchymal stem cells with transforming growth factor- α improves mesenchymal stem cell-mediated cardioprotection, *Shock* **33**, 24–30 (2010).
36. Cui X *et al.* Transplantation of mesenchymal stem cells preconditioned with diazoxide, a mitochondrial ATP-sensitive potassium channel opener, promotes repair of myocardial infarction in rats, *Tohoku J Exp Med* **220**, 139–147 (2010).
37. Korf-Klingebiel M *et al.* Bone marrow cells are a rich source of growth factors and cytokines: implications for cell therapy trials after myocardial infarction, *Eur Heart J* **29**, 2851–2858 (2008).
38. Kang HJ & Kim HS. G-CSF- and erythropoietin-based cell therapy: a promising strategy for angiomyogenesis in myocardial infarction, *Expert Rev Cardiovasc Ther* **6**, 703–713 (2008).

39. Srinivas G, Anversa P & Frishman WH. Cytokines and myocardial regeneration: a novel treatment option for acute myocardial infarction, *Cardiol Rev* **17**, 1–9 (2009).
40. Laugwitz KL *et al.* Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages, *Nature* **433**, 647–653 (2005).
41. Moretti A *et al.* Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification, *Cell* **127**, 1151–1165 (2006).
42. Bu L *et al.* Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages, *Nature* **460**, 113–117 (2009).
43. Smits AM *et al.* Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology, *Nat Protoc* **4**, 232–243 (2009).
44. Laugwitz KL, Moretti A, Caron L, Nakano A & Chien KR. Islet1 cardiovascular progenitors: a single source for heart lineages?, *Development* **135**, 193–205 (2008).
45. The Heart Institute, C.-S.M.C.(.M.M.P.). A Phase I Randomized, Dose Escalation Study of the Safety and Efficacy of Intracoronary Delivery of Cardiosphere-Derived Stem Cells in Patients With Ischemic Left Ventricular Dysfunction and a Recent Myocardial Infarction. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00893360.
46. Bearzi C *et al.* Human cardiac stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14068–14073 (2007).
47. Rota M *et al.* Local activation or implantation of cardiac progenitor cells rescues scarred infarcted myocardium improving cardiac function, *Circ Res* **103**, 107–116 (2008).
48. Tang XL *et al.* Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction, *Circulation* **121**, 293–305 (2010).

49. Chimenti I *et al.* Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice, *Circ Res* **106**, 971–980 (2010).
50. Maxeiner H *et al.* New insights into paracrine mechanisms of human cardiac progenitor cells, *Eur J Heart Fail* **12**, 730–737 (2010).
51. Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I & Hartikainen J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine, *J Am Coll Cardiol* **49**, 1015–1026 (2007).
52. Qiu Y, Hoareau-Aveilla C, Oltean S, Harper SJ & Bates DO. The anti-angiogenic isoforms of VEGF in health and disease, *Biochem Soc Trans* **37**, 1207–1213 (2009).
53. Nowak DG *et al.* Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms: a novel therapeutic strategy for angiogenesis, *J Biol Chem* **285**, 5532–5540 (2010).
54. Catena R *et al.* VEGF121b and VEGF165b are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A, *Mol Cancer* **9**, 320 (2010).
55. Ferrara N, Gerber HP & LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors, *Nat Med* **9**, 669–676 (2003).
56. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress, *Endocr Rev* **25**, 581–611 (2004).
57. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM & Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition, *Cell Signal* **19**, 2003–2012 (2007).
58. Ferrara N & Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells, *Biochem Biophys Res Commun* **161**, 851–858 (1989).
59. Senger DR *et al.* Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid, *Science* **219**, 983–985 (1983).

60. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV & Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen, *Science* **246**, 1306–1309 (1989).
61. Keck PJ *et al.* Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF, *Science* **246**, 1309–1312 (1989).
62. Lambrechts D *et al.* Meta-analysis of vascular endothelial growth factor variations in amyotrophic lateral sclerosis: increased susceptibility in male carriers of the -2578AA genotype, *J Med Genet* **46**, 840–846 (2009).
63. Shinkaruk S, Bayle M, Lain G & Deleris G. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy, *Curr Med Chem Anticancer Agents* **3**, 95–117 (2003).
64. Hsu JY & Wakelee HA. Monoclonal antibodies targeting vascular endothelial growth factor: current status and future challenges in cancer therapy, *BioDrugs* **23**, 289–304 (2009).
65. Ranpura, V., Hapani, S. & Wu, S. Treatment-Related Mortality With Bevacizumab in Cancer Patients: A Meta-analysis, *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **305**, 487–494 (2011).
66. Tufail A *et al.* Bevacizumab for neovascular age related macular degeneration (ABC Trial): multicentre randomised double masked study, *BMJ* **340**, c2459 (2010).
67. Kinnunen K & Yl-Herttuala S. Vascular endothelial growth factors in retinal and choroidal neovascular diseases, *Ann Med* (2011).
68. Ruixing Y, Jiaquan L, Jie C & Dezhai Y. Intravenous administration of vascular endothelial growth factor improves cardiac performance and inhibits cardiomyocyte apoptosis, *Growth Factors* **24**, 209–217 (2006).
69. Vera Janavel G *et al.* Plasmid-mediated VEGF gene transfer induces cardiomyogenesis and reduces myocardial infarct size in sheep, *Gene Ther* **13**, 1133–1142 (2006).

70. Ferrarini M *et al.* Adeno-associated virus-mediated transduction of VEGF165 improves cardiac tissue viability and functional recovery after permanent coronary occlusion in conscious dogs, *Circ Res* **98**, 954–961 (2006).
71. Zentilin L *et al.* Cardiomyocyte VEGFR-1 activation by VEGF-B induces compensatory hypertrophy and preserves cardiac function after myocardial infarction, *FASEB J* **24**, 1467–1478 (2010).
72. Tao Z *et al.* Coexpression of VEGF and angiopoietin-1 promotes angiogenesis and cardiomyocyte proliferation reduces apoptosis in porcine myocardial infarction (MI) heart, *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 2064–2069 (2011).
73. Friehs I *et al.* Vascular endothelial growth factor prevents apoptosis and preserves contractile function in hypertrophied infant heart, *Circulation* **114**, I290-5 (2006).
74. Chen T *et al.* Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor 165 (VEGF165) Protects Cardiomyocytes Against Doxorubicin-Induced Apoptosis, *J Chemother* **22**, 402–406 (2011).
75. Shimojo N *et al.* Contributory role of VEGF overexpression in endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H474-81 (2007).
76. Zhou Y, Jiang Y & Kang YJ. Copper reverses cardiomyocyte hypertrophy through vascular endothelial growth factor-mediated reduction in the cell size, *J Mol Cell Cardiol* **45**, 106–117 (2008).
77. Zhou Y, Bourcy K & Kang YJ. Copper-induced regression of cardiomyocyte hypertrophy is associated with enhanced vascular endothelial growth factor receptor-1 signalling pathway, *Cardiovasc Res* **84**, 54–63 (2009).
78. Chen Y *et al.* Vascular endothelial growth factor promotes cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H1653-8 (2006).
79. Song YH *et al.* VEGF is critical for spontaneous differentiation of stem cells into cardiomyocytes, *Biochem Biophys Res Commun* **354**, 999–1003 (2007).

80. Dai Y *et al.* HIF-1alpha induced-VEGF overexpression in bone marrow stem cells protects cardiomyocytes against ischemia, *J Mol Cell Cardiol* **42**, 1036–1044 (2007).
81. Sadat S *et al.* The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF, *Biochem Biophys Res Commun* **363**, 674–679 (2007).
82. Kim SH *et al.* Hypoxia-inducible Vascular Endothelial Growth Factor-engineered Mesenchymal Stem Cells Prevent Myocardial Ischemic Injury, *Mol Ther* (2011).
83. Piper, H.M., Probst, I., Schwartz, P., Hütter, F.J. & Spieckermann, P.G. Culturing of Calcium Stable Adult Cardiac Myocytes, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **14**, 397–412 (1982).
84. Langer, M., Lüttecke, D. & Schlüter, K.-D. Mechanism of the positive contractile effect of nitric oxide on rat ventricular cardiomyocytes with positive force/frequency relationship, *Pflugers Arch.* **447**, 289–297, doi:10.1007/s00424-003-1187-8 (2003).
85. LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680–685, <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0> (1970).
86. Mullis, K. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51 Pt 1**, 263–273 (1986).
87. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA & Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR, *J Biol Chem* **269**, 25646–25654 (1994).
88. Chandrasekar B, Smith JB & Freeman GL. Ischemia-reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor-KappaB and induces neutrophil infiltration via lipopolysaccharide-induced CXC chemokine, *Circulation* **103**, 2296–2302 (2001).

89. Damas JK *et al.* CXC-chemokines, a new group of cytokines in congestive heart failure--possible role of platelets and monocytes, *Cardiovasc Res* **45**, 428–436 (2000).
90. Zhou L *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 induces a novel transcription factor that causes cardiac myocyte apoptosis and ventricular dysfunction, *Circ Res* **98**, 1177–1185 (2006).
91. Niu J & Kolattukudy PE. Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications, *Clin Sci (Lond)* **117**, 95–109 (2009).
92. Sundstrom J *et al.* Relations of plasma total TIMP-1 levels to cardiovascular risk factors and echocardiographic measures: the Framingham heart study, *Eur Heart J* **25**, 1509–1516 (2004).
93. Hansson J, Lind L, Hulthe J & Sundstrom J. Relations of serum MMP-9 and TIMP-1 levels to left ventricular measures and cardiovascular risk factors: a population-based study, *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* **16**, 297–303 (2009).
94. Seko Y *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) activates Raf-1, mitogen-activated protein (MAP) kinases, and S6 kinase (p90rsk) in cultured rat cardiac myocytes, *J Cell Physiol* **175**, 239–246 (1998).
95. Rousseau, S. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase, *J. Biol. Chem* **275**, 10661–10672 (2000).
96. Takahashi T, Ueno H & Shibuya M. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells, *Oncogene* **18**, 2221–2230 (1999).

9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung der Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Gießen, im Dezember 2011

10. Danksagung

Ich möchte mich besonders bei Professor K.-D. Schlüter für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken, für die ausgezeichnete Betreuung und für die vielen Male, die ich sein Büro mit mehr Zuversicht und besserer Laune verlassen habe, als ich es zuvor betreten hatte.

Weiterhin danke ich Nadine Woitasky und Dr. Rolf Schreckenbergs für ihre Erläuterungen der verschiedenen Methoden und ihre Betreuung bei der Durchführung zahlreicher Versuche; Peter Volk und Daniela Schreiber für die Präparation der Kardiomyozyten und ihre weit darüber hinausgehende Präsenz und Hilfsbereitschaft, letztlich allen Mitarbeitern und Doktoranden der Arbeitsgruppen Schlüter und Euler, welche die freundschaftliche Atmosphäre und den Spaß ermöglichten.

Danke an Tanja Häring, die freiwillig zum Korrekturlesen bereitgestellt wurde.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich für den stetigen Zuspruch und die vielseitige Unterstützung nicht nur im Rahmen dieser Arbeit.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5923-1



9 78 3 8359 5923 1